

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2001年7月5日 (05.07.2001)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 01/48151 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 5/06,  
5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, 33/44, A61P  
9/06, 9/04 // A61K 38/18, C12N 15/12

Satoshi); 〒157-0066 東京都世田谷区成城5-12-15  
Tokyo (JP). 桜田一洋 (SAKURADA, Kazuhiro). 山田  
陽史 (YAMADA, Yoji); 〒194-8533 東京都町田市旭町  
3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内  
Tokyo (JP). 五條理志 (GOJO, Satoshi); 〒350-0414 埼  
玉県入間郡越生町越生東2-7-3-303 Saitama (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP00/09323

(22)国際出願日: 2000年12月27日 (27.12.2000)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願平11/372826

1999年12月28日 (28.12.1999) JP

特願平PCT/JP00/01148

2000年2月28日 (28.02.2000) JP

特願平PCT/JP00/07741

2000年11月2日 (02.11.2000) JP

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(71)出願人: 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO  
KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田  
区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72)発明者: 梅澤明弘 (UMEZAWA, Akihiro); 〒270-0014  
千葉県松戸市小金316 Chiba (JP). 秦 順一 (HATA,  
Jun-ichi); 〒141-0031 東京都品川区西五反田2-13-10  
Tokyo (JP). 福田恵一 (FUKUDA, Keiichi); 〒176-0006  
東京都練馬区栄町3-2 Tokyo (JP). 小川 聰 (OGAWA,

(54)Title: CELLS CAPABLE OF DIFFERENTIATING INTO HEART MUSCLE CELLS

A1 (54)発明の名称: 心筋細胞への分化能を有する細胞

WO 01/48151 A1 (57)Abstract: Methods of isolating, purifying, culturing and differentiation-inducing cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; a method of proliferating cells which are capable of differentiating into heart muscle cells and a method of regulating the differentiation thereof into heart muscle cells by using various cytokines, transcriptional factors, etc.; a method of acquiring a surface antigen specific to cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; a method of acquiring a gene encoding this surface antigen; a method of acquiring an antibody specific to the above surface antigen; a method of acquiring a protein and a gene participating in the proliferation of cells which are capable of differentiating into heart muscle cells and differentiation thereof into heart muscle cells; remedies for various heart diseases with the use of cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; and a method of inducing the differentiation of various cells (nerve cells, liver cells, fat cells, skeletal muscle cells, vascular endothelial cells, osteoblasts, etc.) and tissues by using cells which are capable of differentiating into heart muscle cells.

[続葉有]



## (57) 要約:

本発明は、心筋細胞への分化能を有する細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。本発明はさらに心筋細胞への分化能を有する細胞を用いて、神経系細胞、肝細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞など様々な細胞、組織を分化誘導する方法に関する。

## 明細書

### 心筋細胞への分化能を有する細胞

#### 技術分野

本発明は、心筋細胞への分化能を有する細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。

#### 背景技術

心筋細胞は、出生前は自律拍動しながら活発に細胞分裂を行っている。しかし、出生と同時にその分裂能は喪失し、肝細胞のように再び細胞分裂能を獲得することはなく、また骨格筋細胞とも異なり衛星細胞といった未分化な前駆細胞を持つこともない。従って、心筋梗塞、心筋炎または老化等に伴い心筋細胞が壊死すると、生体内では残存心筋細胞の細胞分裂ではなく細胞の肥大がおきる。心肥大は初期においては生理的適応であるが、また共存する心線維芽細胞の増殖による間質の線維化と相まって心臓自体の拡張機能の低下、さらには収縮機能の低下へと結びつき心不全を呈するようになる。心筋梗塞等による心不全のこれまでの治療は心収縮力の増強、血管拡張薬による心臓の圧負荷・容量負荷の軽減、利尿薬による血流量の減少等の対症療法を中心に行われてきた。これに対し、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰等の問題から心臓移植が一般的な医療に普及するのは簡単ではない。実際、心臓病は我が国の死亡原因の第3位となっており(厚生白書平成10年)、失われた心筋細胞を再生することができれば医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

現在までに、心筋細胞の性質を保存した細胞株としては、心房性ナトリウム利尿ホルモン

のプロモーターに SV40 の large T 抗原を組み換えて作製したトランスジェニックマウスの心房に生じた腫瘍から株化された AT-1 細胞があげられる[*Science*, 239; 1029–1038 (1988)]。しかしながら、該細胞は *in vivo* に移植すると腫瘍を形成するため、細胞移植には適さないという問題がある。そこで、このような背景のもと、心筋を再構築するため以下の方法が考えられた。

1つ目の方法は、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に変換する方法である。これは、線維芽細胞に MyoD を導入すると骨格筋細胞に変換できることから類推された。これまでに、マウスの胎児性癌細胞である P19 細胞での成功例は示されているものの[*Cell Struct. & Func.*, 21: 101–110 (1996)]、非ガン細胞での成功例は報告されていない。

2つ目の方法は、心筋細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に心筋が拍動しながら分裂できる現象に基づいている。しかしながら、これまでに成功例は報告されていない。

3つ目の方法は、未分化な幹細胞から心筋細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から心筋細胞を誘導できることが示されているが、胚性幹細胞自身を成体に移植するとカルシノーマを形成すること、抗原性などの問題が存在する[*Nature Biotechnology*, 17, 139–142 (1999)]。

従って、胚性幹細胞を現実の医療へと応用するためには、少なくとも心筋前駆細胞あるいは、心筋細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性は示唆されているが、煩雑な操作を必要とすることから一般的な医療への応用は容易ではない。

中絶胎児から未分化な細胞である心筋前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられており、動物を用いた実験では心筋細胞として有効に機能することが知られている [*Science*, 264, 98–101 (1994)]。しかしながら、この方法で大量の心筋前駆細胞を取得することは困難であり、倫理の観点からも一般的な医療への応用は容易ではない。

成体骨髓には造血系幹細胞および血管幹細胞以外に間葉系幹細胞が存在し、間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、韌帶細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、ストローマ細胞、肝臓 oval 細胞が分化誘導できることが報告されている[*Science*, 284, 143–147 (1999); *Science*, 284, 1168–1170 (1999)]。一方、最近、マウス成体の骨髓から取得した細

胞から、心筋細胞が分化誘導できることを見い出した[J. Clinical Investigation, 103, 10–18 (1999)]。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitro で細胞培養および薬剤処理を行った後に、心臓の障害部位へ移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している[J. Clinical Investigation, 103, 591–592 (1999)]。しかしながら、該報告は、成体マウスの骨髓から樹立した不死化細胞の一部が心筋細胞に分化できることを示したものにすぎない。また、成体骨髓中の心筋細胞に分化する能力を有する細胞の特性の同定、該細胞を増殖する方法、該細胞から効率的に心筋細胞に分化誘導する方法については明らかでなかった[J. Clinical Investigation, 103, 591–592 (1999)]。

生体内の組織から目的の細胞を取得する方法として、各種表面抗原を認識する抗体が用いられている。例えば、未熟な造血幹細胞では CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD90(Thy-1)+の特性を有していること、また、造血幹細胞が分化するに従い、CD38 が発現し CD90(Thy-1)が消失することが知られている[蛋白質核酸酵素 Vol. 45, No13, 2056–2062(2000)]。血管内皮細胞では、CD 34、CD 31、Flk-1、Tie-2、E-セレクチン等のマーカーを発現しており[分子心血管病 Vol. 1, No. 3, 294–302 (2000)]、骨髓の間葉系幹細胞では CD 90、CD 105、CD 140等のマーカーを発現している[Science, 284, 143–147 (1999); Science, 284, 1168–1170 (1999)]。しかしながら、心筋や血管内皮細胞を誘導できる幹細胞の表面マーカーについては明らかにされていない。

### 発明の開示

現在の心疾患治療より安全かつ確実な治療が望まれている。そこで、骨髓細胞などの生体組織または臍帯血より心筋細胞への分化能を有する細胞を選別し、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖または分化をコントロールすることは、骨髓由来の細胞などの生体細胞または臍帯血を用いた心筋の再生治療の開発に有用である。そのために、心筋細胞への分化能を有する細胞を単離して、該細胞の増殖または分化に働くサイトカインまたは転写因子を同定することが必要である。

本発明者は上記問題点を開発すべく鋭意研究し、以下の結果を得た。すなわち、マウス骨髓由来の細胞を1細胞レベルにまず分離を行い、多数の細胞株を取得した。これら細胞株を一つ一つ、5-アザシチジン処理を行うことで心筋形成能を有する細胞株を複数取得

した。次に選られた細胞株を、GFP(Green Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することで、骨髓由来の細胞が、心筋細胞および脂肪細胞の少なくとも2種類の異なる細胞を分化誘導できる多分化能(Purulipotent)を持った幹細胞であることを見い出した。さらに、該幹細胞は5-アザシチジンだけでなく、DMSO(dimethyl sulfoxide)などの他のゲノムDNAの脱メチル化剤の投与によつても、確率的(stochastic)に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化することを見出し、ゲノムDNAの脱メチル化が骨髓由来の細胞からの心筋細胞への分化誘導に有効であることを明らかにした。またFGF-8, ET1, Midkine, BMP4の4種類のうち少なくとも一種のサイトカインと5-アザシチジンとを組み合わせて添加することで骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子である ANP(atrral natriuretic peptide)および cTnI(cardiac Troponin I)の発現を促進できることを見出した。同様に Nkx2.5 および GATA4 の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現を行つた後、5-アザシチジン処理を行うことで、心筋細胞への分化が約50倍促進できることを見出した。また骨髓由来の細胞を心筋細胞の細胞外基質をコートした培養皿で培養することで、骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子である ANP および cTnI の発現を特異的に促進できることを見出した。さらに、骨髓由来の細胞を心筋由来の初代培養細胞と共に培養を行うことで骨髓由来の細胞から心筋の形成が約10倍促進することを見出した。また、Nkx2.5, GATA4 の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現させることと、心筋細胞との共培養を組み合わせることで、約500倍心筋への分化が促進することを見出した。

次に移植実験により、骨髓由来の細胞の分化能力を検討した。まずマウス成体心臓に移植することで、骨髓由来の細胞が心筋と血管に分化することを見出した。さらに成体マウスの筋肉に移植することで骨格筋を形成できることを見出した。またマウス胚盤胞に移植すると、誕生したマウスの中枢神経系、肝臓、心臓で移植した細胞由来の組織が形成された。中枢神経系は外胚葉系、肝臓は内胚葉系、心臓は中胚葉系の組織である。

これらの結果は、本発明で見出した骨髓由来の細胞が、今まで知られていた骨髓に存在する造血系組織にのみ分化する造血幹細胞および骨格筋、脂肪細胞、骨などの沿軸中胚葉系組織にのみ分化する間葉系幹細胞とは異なる性質、すなわち外胚葉系、中胚葉系および内胚葉系の3胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示している。

また、本発明の骨髓由来の細胞を造血系細胞の表面抗原であるCD 34、CD 117、CD 14、CD 45、CD 90、Sca-1、Ly6c、Ly6gを認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原であるFlk-1、CD 31、CD 105、CD 144を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原であるCD 140を認識する抗体、インテグリンの表面抗原であるCD 49b、CD 49d、CD 29、CD 41を認識する抗体、マトリックス受容体であるCD 54、CD 102、CD 106、CD 44を認識する抗体などを用いて骨髓由来の細胞の表面抗原の発現を解析することにより、今までに知られていない全く新しい発現形態を示している全能性の幹細胞であることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の(1)～(91)を提供するものである。

- (1) 生体組織または臍帯血から単離され、少なくとも心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
- (2) 生体組織が骨髓である、上記(1)記載の細胞。
- (3) 細胞が、多分化能幹細胞であることを特徴とする、上記(1)または(2)記載の細胞。
- (4) 細胞が、少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の細胞。
- (5) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の細胞。
- (6) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の細胞。
- (7) 細胞が、成体組織のいかなる細胞にも分化する能力を有する全能性幹細胞であることを特徴とする、上記(1)～(3)記載の細胞。
- (8) 細胞が CD 117陽性および CD 140陽性である、上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の細胞。
- (9) 細胞が、さらに CD 34陽性である、上記(8)記載の細胞。
- (10) 細胞が、さらに CD 144陽性である、上記(9)記載の細胞。

- (11) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(9)記載の細胞。
- (12) 細胞が、CD 34陰性である、上記(8)記載の細胞。
- (13) 細胞が、さらに CD 144陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (14) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(12)記載の細胞。
- (15) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(10)記載の細胞。
- (16) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(11)記載の細胞。
- (17) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (18) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(13)記載の細胞。
- (19) Hoechst 33342を取り込まない、上記(1)記載の細胞。
- (20) 上記(1)～(19)のいずれか1項に細胞から誘導される心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞。
- (21) 心室筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (22) 洞結節細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (23) 生体組織または臍帯血がほ乳動物由来のものである、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (24) ほ乳動物がマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サルおよびヒトから選ばれる1種である、上記(23)記載の細胞。
- (25) 細胞が、マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、上記

(1)～(8)のいずれか1項に記載の細胞。

(26) 染色体DNAの脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(25)のいずれか1項に記載の細胞。

(27) 染色体DNAの脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド(DMSO)からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、上記(26)記載の細胞。

(28) デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、上記(27)記載の細胞。

(29) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(30) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(29)記載の細胞。

(31) サイトカインが血小板由来増殖因子(PDGF)、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(32) PDGFが配列番号3または5で表されるアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64で表されるアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(31)記載の細胞。

(33) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(34) ビタミンがレチノイン酸である、上記(30)記載の細胞。

(35) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5およびMesP1からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(36) Nkx2)5/Csxが配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4が配列番号11で表さ

れるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(35)記載の細胞。

(37) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(30)記載の細胞。

(38) 線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)により心筋細胞への分化が抑制される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(39) FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、上記(3)～(8)記載の細胞。

(40) 心臓に移植することにより心筋細胞または血管に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(41) 胚盤胞に移植すること、または心筋細胞と共に培養を行うことにより、心筋に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(42) 核内受容体 PPAR- $\gamma$  を活性化因子により脂肪細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(43) 核内受容体 PPAR- $\gamma$  の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(42)記載の細胞。

(44) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(43)記載の細胞。

(45) 胚盤胞に移植すること、または脳または脊髄に移植することにより、神経系細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(46) 胚盤胞に移植すること、または肝臓に移植することにより、肝細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(47) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の

細胞から心筋を形成する方法。

(48) 染色体DNAの脱メチル化剤を用いて、上記(9)記載の細胞から上記(12)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(49) 染色体DNAの脱メチル化剤を用いて、CD 117陰性およびCD 140陽性の細胞から上記(8)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(50) 染色体DNAの脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびDMSOからなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(48)および(49)記載の方法。

(51) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(50)記載の方法。

(52) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

(53) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(52)記載の方法。

(54) サイトカインがPDGF、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(55) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(54)記載の方法。

(56) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(57) ビタミンがレチノイン酸である、上記(53)記載の方法。

(58) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、

dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(59) Nkx2)5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(58)記載の方法。

(60) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(53)記載の方法。

(61) 核内受容体 PPAR- $\gamma$  を活性化する因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から脂肪細胞を分化させる方法。

(62) 核内受容体 PPAR- $\gamma$  の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(61)記載の方法。

(63) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(62)記載の方法。

(64) 染色体DNAの脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

(65) 染色体DNAの脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチジンおよびDMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(64)記載的心筋形成剤。

(66) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(65)記載的心筋形成剤。

(67) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

(68) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外

基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(67)記載の心筋形成剤。

(69) サイトカインがPDGF、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)、骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(70) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(69)記載の心筋形成剤。

(71) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィプロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(72) ビタミンガレチノイン酸である、上記(71)記載の心筋形成剤。

(73) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(74) Nkx2)5/Csxが配列番号9記載のアミノ酸配列で表される、GATA4が配列番号11記載のアミノ酸配列、MEF-2Aが配列番号13記載のアミノ酸配列、MEF-2Bが配列番号15記載のアミノ酸配列、MEF-2Cが配列番号17記載のアミノ酸配列、MEF-2Dが配列番号19記載のアミノ酸配列、dHANDが配列番号21記載のアミノ酸配列、eHANDが配列番号23記載のアミノ酸配列、TEF-1が配列番号25記載のアミノ酸配列、TEF-3が配列番号27記載のアミノ酸配列、TEF-5が配列番号29記載のアミノ酸配列、MesP1が配列番号62記載のアミノ酸配列でそれぞれ表される、上記(73)記載の心筋形成剤。

(75) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(68)記載の心筋形成剤。

(76) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

(77) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生薬。

(78) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された

上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

(79) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(80) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

(81) 上記(80)記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法。

(82) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に特異的な表面抗原を取得する方法。

(83) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

(84) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

(85) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

(86) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

(87) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(86)記載の方法。

(88) テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(89) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(88)記載の治療薬。

(90) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

(91) 上記(90)記載の培養上清を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞としては、骨髓、筋肉、脳、肺臓、肝臓、腎臓などの成体組織または臍帯血から単離することが可能であるが、好ましくは骨髓または臍帯血があげられる。

本発明の多分化能幹細胞としては、心筋細胞とそれ以外の細胞に分化する能力を有する細胞であればいかなる細胞でもよい。好ましくは少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する細胞などがあげられる。

また、本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞であれば、本発明に包含される。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞があげられる。CD117 陽性および CD140 陽性である細胞としては、好ましくは CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは CD144 陽性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陽性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、さらに好ましくは CD 34 陽性、CD 117 陽性、CD 14 陰性、CD 45 陰性、CD 90 陰性、Flk-1 陰性、CD 31 陰性、CD 105 陰性、CD 14 陽性、CD 140 陽性、CD 49b 陰性、CD 49d 陰性、CD 29 陽性、CD 54 陰性、CD 102 陰性、CD 106 陰性および CD 44 陽性である細胞、CD 34 陽性、CD 117 陽性、CD 14 陰性、CD 45 陰性、CD 45 陰性、CD 90 陰性、Flk-1 陰性、CD 31 陰性、CD 105 陰性、CD 144 陰性、CD 140 陽性、CD 49b 陰性、CD 49d 陰性、CD 29 陽性、CD 54 陰性、CD 102 陰性、CD 106 陰性および CD 44 陽性である細胞、CD 34 陰性、CD 117 陽性、CD 14 陰性、CD 45 陰性、CD 90 陰性、F

Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陰性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性およびCD 44陽性である細胞があげられる。CD117 陽性およびCD140 陽性である細胞としては、マウス骨髓由来多分化能間細胞である BMSC があげられる。マウス骨髓由来多分化能幹細胞 BMSC は、平成12年2月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に FERM BP-7043 として寄託されている。

本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞としては、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、好ましくは CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは、CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞があげられる。CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞としては、KUM2 細胞があげられる。

本発明で使用される成体組織または臍帯血の種としては、脊椎動物、好ましくは温血動物、特に好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物などが用いられる。ヒトの治療用途にはヒト由来であることが好ましい。

上記動物から、成体組織または臍帯血から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離し、培養した後に、心筋細胞への分化能を有する細胞を分化、誘導することにより、心筋細胞を得ることができる。

また、本発明の多分化能幹細胞を用いて、心筋細胞だけでなく、血管内皮細胞、平滑筋、骨格筋細胞、脂肪細胞、骨、軟骨、臍内分泌系細胞、臍外分泌系細胞、肝細胞、腎球体細胞、腎尿細管細胞、ニューロン、グリア、オリゴデンドロサイトなどへの分化を誘導することにより、各種細胞を得ることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

## 1. 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、成体組織または臍帯血など心筋細胞への分化能を有する細胞を取得することが可能な組織であればいかなる組織からでも単離することができる。以下に、骨髓から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法を述べる。

### (1) 骨髓から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法

ヒトの骨髓より心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を取得する方法としては、安全かつ効率的に取得される方法であれば特に限定されないが、S. E. Haynesworth et al. Bone, 13, 81 (1992)に記載された方法に基づき行うことができる。

胸骨または腸骨から骨髓穿刺を行う。骨髓穿刺を行う場所の皮膚面を消毒し、局所麻酔を行う。特に骨膜下を充分に麻酔する。骨髓穿刺針の内筒を抜き、5000units のヘパリンを入れた 10ml 注射器を装着して必要量の骨髓液を速やかに吸引する。平均的には 10ml～20ml の骨髓液を吸引する。骨髓穿刺針を取り外し、10 分間程圧迫止血する。取得した骨髓液を  $1,000 \times g$  の遠心分離により骨髓細胞を回収した後、該骨髓細胞を PBS (Phosphate Buffered Saline)で洗浄する。本ステップを2回繰り返した後、該骨髓細胞を 10%の FBS(牛胎仔血清)を含む  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM)あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium)等の細胞培養用培地に再浮遊させることにより骨髓細胞液を得ることができる。

該骨髓細胞液から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法としては、溶液中に混在する他の細胞、例えば血球系細胞、造血幹細胞、血管幹細胞および線維芽細胞などを除去できれば特に限定されないが、M. F. Pittenger et al. Science, 284, 143 (1999)に記載された方法に基づき骨髓細胞液を密度  $1.073g/ml$  の percoll に重層した後、 $1,100 \times g$  で 30 分間遠心分離して界面の細胞を回収することにより単離することができる。また、該骨髓細胞液に  $10 \times PBS$  を加えて  $9/10$  に希釈した percoll を同容量加えて混合した後に、 $20,000 \times g$  で 30 分間遠心分離し、密度  $1.075 \sim 1.060$  の画分を回収することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混合物を取得することができる。

上記方法により取得した該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混

合物は、96 穴の培養プレートの各穴に 1 細胞のみが注入されるように希釈して、1 細胞由来のクローンを多数調製した後、以下に記載した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞から心筋細胞を誘導する方法を用いて該クローンを処理し、自律拍動する細胞が出現するクローンを選択することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を得ることができる。

ラットやマウスから心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を取得する方法としては、特に限定されないが以下の手順で取得することができる。ラットあるいはマウスを頸椎脱臼により致死させ、70%エタノールで充分消毒した後、大腿骨の皮膚ならびに大腿四頭筋を切除する。膝関節の部分にハサミをいれて関節をはずし、大腿骨背面の筋肉を除去する。股関節の部分にハサミを入れて関節を外し、大腿骨を取り出す。大腿骨に付着している筋肉をハサミでできるだけ除去した後、大腿骨の両端をハサミで切断する。骨の太さに応じた適当なサイズの針を 2.5ml の注射器に装着し、10%の FBS(牛胎仔血清)を含む  $\alpha$ -MEM、DMEM、あるいは IMDM 等の細胞培養用培地約 1.5ml を注射器に充填した後、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込む。注射器内の培養液を骨髓内に注入することで、股関節側の断端から骨髓細胞が押し出される。得られた骨髓細胞はピペッティングにより培養液中に浮遊させる。該骨髓液からは、上記のヒト骨髓液からの骨髓細胞の単離と同様の方法により、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離することができる。

## (2) 骨髓以外の組織から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法

後述する 12 に記載の抗体を用いた分離方法により、心筋細胞への分化能を有する細胞を、骨髓以外の組織からも取得することができる。

骨髓以外の組織としては、好ましくは臍帯血があげられる。具体的には、以下の方法で行うことができる。

まず臍帯から臍帯血を分取し、ただちに 500units/ml の終濃度になるようにヘパリンを加える。よく混合した後、遠心分離して臍帯血から細胞を分取し、10%の FBS(牛胎仔血清)を含む  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM)あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium)等の細胞培養用培地に再浮遊させる。得られた細胞液から後述する抗体を利用して、心筋細胞への分化能を有する細胞を分離することができる。

## 2. 心筋細胞への分化能を有する細胞の培養

上記1の方法により単離した、心筋細胞への分化能を有する細胞を培養するために用いる培地としては、通常公知(組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店 1996)の組成の細胞培養用培地を用いることができるが、好ましくは牛等の血清を5~20%添加した、 $\alpha$ -MEM、DMEMあるいはIMDM等の細胞培養用培地などが用いられる。培養条件は、細胞が培養可能であればいかなる条件でもよいが、培養温度は33~37°Cが好ましく、さらに5~10%の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養することが好ましい。心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖することが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させる。浮遊した細胞は、PBSあるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で5倍から20倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養することができる。

## 3. 心筋細胞への分化能を有する細胞からの心筋細胞の誘導方法

心筋細胞への分化能を有する細胞より心筋細胞を誘導する方法としては、(1)DNAの脱メチル化剤処理による分化誘導、(2)胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、(3)心筋細胞への分化能を有する細胞または該細胞から分化した心筋細胞の培養上清による分化誘導などの方法を挙げることができる。これらの方法を単独あるいは組み合わせることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞から心筋細胞を誘導することができる。また、本来、心筋細胞への分化能を有していない間葉系細胞も、これらの方法を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞へと分化し、心筋細胞を誘導することができる。

DNAの脱メチル化剤としては、DNAに対して脱メチル化を引き起こす化合物であればいかなるものでもよい。DNAの脱メチル化剤としては、染色体DNA中のGpC配列中のシトシン残基のメチル化を特異的に阻害する酵素であるデメチラーゼ、5-アザシチジン(以下5-aza-Cと略す)、DMSO(dimethyl sulfoxide)などがあげられる。デメチラーゼとしては、配列番号1記載のアミノ酸配列を有するデメチラーゼ[Nature, 397, 579-583 (1999)]などがあげられる。DNAの脱メチル化剤処理による分化誘導の具体例を以下に示す。

3  $\mu$  mol/lから10  $\mu$  mol/lの間の濃度になるように5-aza-Cを心筋細胞への分化能を有

する細胞を含む培地中に添加し、24時間上記培養条件下でインキュベーションする。培地を交換することで5-aza-Cを除去し、さらに2～3週間培養することで心筋細胞を取得することができる。形成される心筋細胞は培養2～3週間目では洞結節細胞が中心であるが、培養4週間目以降心室型心筋細胞を分化誘導することができる。

胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、血小板由来増殖因子(以下、PDGFと略記する。)、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子4(BMP4)などをあげることができる。PDGFとしてはPDGF A、PDGF B、PDGF Cなどがあげられ、具体的には配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)としては配列番号64のアミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン1(ET1)としては配列番号66のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(midkine)としては配列番号68のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子4(BMP4)としては配列番号70のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば10～40ng/mlの濃度で用いられる。

また、心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進することも可能である。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインとしては、線維芽細胞増殖因子-2(以下、FGF-2と略記する。)、具体的には、配列番号7または8で表されるFGF-2などをあげることができる。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤としては、サイトカインの情報伝達を阻害する物質、例えばサイトカインを中和する抗体、低分子化合物などをあげることができる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、

例えば、 $10^{-9}M$  の濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓の発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス蛋白質等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx(配列番号 9:アミノ酸配列、配列番号 10:塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4(配列番号 11:アミノ酸配列、配列番号 12:塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A(配列番号 13:アミノ酸配列、配列番号 14:塩基配列)、MEF-2B(配列番号 15:アミノ酸配列、配列番号 16:塩基配列)、MEF-2C(配列番号 17:アミノ酸配列、配列番号 18:塩基配列)と MEF-2D(配列番号 19:アミノ酸配列、配列番号 20:塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND(配列番号 21:アミノ酸配列、配列番号 22:塩基配列)、eHAND(配列番号 23:アミノ酸配列、配列番号 24:塩基配列)と MesP1(配列番号 61:アミノ酸配列、配列番号 62:塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子 ファミリーに属する TEF-1(配列番号 25:アミノ酸配列、配列番号 26:塩基配列)、TEF-3(配列番号 27:アミノ酸配列、配列番号 28:塩基配列)と TEF-5(配列番号 29:アミノ酸配列、配列番号 30:塩基配列)などをあげることができる。

上述した転写因子は、該因子をコードする DNA を心筋細胞への分化能を有する細胞中に導入し、DNA を発現させることにより心筋細胞への分化を誘導させることができる。

また、自律拍動する心筋細胞から取得した細胞外基質をコートした培養皿を用いて培養すること、自律拍動する心筋細胞と共に培養すること、自律拍動する心筋細胞の培養上清を添加することで、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

また、4に示す方法で得られる心筋細胞への分化を誘導する因子(以下、心筋分化誘導因子と称する)を用いても、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞に分化誘導することができる。

#### 4. 心筋分化誘導因子の取得

心筋分化誘導因子の取得方法としては、自律拍動する細胞の培養上清に各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析ならびにクロマトグラフィーなどを組み合わせることにより取得することができる。

さらにマイクロシーケンサーを用いて、上記の心筋分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計した DNA プローブを用いて該自律拍動する細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、心筋分化誘導因子の遺伝子を取得することができる。

##### 5. 心筋細胞への分化能を有する細胞を含む心臓再生薬または心臓疾患治療薬

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、心臓再生薬または心臓疾患治療薬として用いることができる。

心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うつ血性心不全、不整脈、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、弁膜症などをあげることができる。

心臓再生薬としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を高純度で含み、心臓の障害部位ならびに大きさに応じて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖させたもの、好ましくは、心筋細胞への分化能を有する細胞から、心筋内皮細胞(Endocardial endothelial cell)、クッション細胞(Cushion cell)、心室型心筋細胞、心房型心筋細胞、洞結節細胞等の心臓を形成する様々な細胞へ分化誘導できる細胞が用いられる。

これらの薬剤は、心筋梗塞の患者骨髓液中から上述した密度勾配遠心分離法、後述する心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[J. Immunol., 141(8), 2797–2800 (1988)]あるいは FACS 法[Int. Immunol., 10(3), 275–283 (1998)]、または心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により該心筋細胞への分化能を有する細胞の精製を行うことにより、製造することができる。

また該薬剤には、後述する心筋形成剤を用いて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓細胞より、後述する不死化方法を利用して細胞分裂能を賦活させた心筋細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

上記方法で製造した治療薬は、上記心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識

する抗体とFACS法を組み合わせることで純度を検定することができる。

上記の治療薬を障害部位に輸送する方法としては、カテーテルを利用する方法等が用いられる。以下虚血性心疾患を例に具体的な方法を示す。虚血性心疾患で障害を受けた心筋細胞は、血管狭窄部位の下流に存在することから、上記の細胞を注入する前に、冠動脈造影法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)により血管の狭窄部位を同定しておく必要がある。器質的狭窄病変は狭窄病態に応じて求心性狭窄、偏心性狭窄、多発性壁不整に分類され、特に偏心性狭窄はタイプIおよびタイプIIの2つのタイプに細分類される。狭窄形態は狭心症の経過、予後に関連することが知られており、タイプIIの偏心性狭窄や多発性壁不整は不安定狭心症例に多く、心筋梗塞に移行する可能性が高い。血管が完全に狭窄している場合には、注入する細胞が障害部位に到達しない可能性があるので、事前に経皮的冠動脈形成術(PTCA)あるいは血栓溶解療法などにより狭窄部位を再開することが必要である。障害を受けた心筋細胞の部位に応じて、注入する細胞を心室型や心房型のように区別することができる。カテーテルの挿入法は右上腕動脈より挿入するSones法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)あるいは大腿動脈より挿入するJundkins法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)を利用することができる。

## 6. 心筋形成剤

本発明の心筋形成剤は、染色体DNAの脱メチル化剤、胎児の心臓発生領域で発現している因子、あるいは胎児の心臓発生段階で心筋細胞への分化に働く因子、心筋分化誘導因子の少なくとも一種類を有効成分として含有し、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

当該心筋形成剤としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、PDGF、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子4(BMP4)などをあげることができる。PDGFとしては配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)としては配列番号64の

アミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン1(ET1)としては配列番号66のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(Midkine)としては配列番号68のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子4(BMP4)としては配列番号70のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば10～40ng/mlの濃度で用いられる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、例えば $10^{-9}$  Mの濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx(配列番号 9:アミノ酸配列、配列番号 10:塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4(配列番号 11:アミノ酸配列、配列番号 12:塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A(配列番号 13:アミノ酸配列、配列番号 14:塩基配列)、MEF-2B(配列番号 15:アミノ酸配列、配列番号 16:塩基配列)、MEF-2C(配列番号 17:アミノ酸配列、配列番号 18:塩基配列)と MEF-2D(配列番号 19:アミノ酸配列、配列番号 20:塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND(配列番号 21:アミノ酸配列、配列番号 22:塩基配列)、eHAND(配列番号 23:アミノ酸配列、配列番号 24:塩基配列)と MesP1(配列番号 61:アミノ酸配列、配列番号 62:塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1(配列番号 25:アミノ酸配列、配列番号 26:塩基配列)、TEF-3(配列番号 27:アミノ酸配列、配列番号 28:塩基配列)と TEF-5(配列番号 29:アミノ酸配列、配列番号 30:塩基配列)などをあげることができる。

該心筋形成剤には心筋分化誘導因子の遺伝子を有効成分として含むものと、心筋分化誘導因子の本体である蛋白質を有効成分として含むものがある。

#### (1) 心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする場合の調製法について述べる。

まず、心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA 断片、あるいは全長 cDNA をウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。

該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えばヒト腎臓由来の HEK293 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 などを用いることができる。

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来の gag、pol、env などの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合は HIV ウィルス由来の gag、pol、env、vpr、vp<sub>u</sub>、vif、tat、rev、nef などの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来の E1A、E1B などの蛋白質、アデノ随伴ウィルスの場合は Rep(p5,p19,p40)、Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

ウイルスベクタープラスミドとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、心臓先天性遺伝子疾患の原因遺伝子に対する野生型の遺伝子を心筋細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

ウイルスベクタープラスミドとしては MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733–6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587–3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150–8157 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816–3821 (1995)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒト CMV)の IE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトショック蛋白質プロモーター、SR  $\alpha$  プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。また、Nkx2.5/Csx 遺伝子のような心筋細胞特異的な遺伝子のプロモーターを用いることで、心筋細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

上記組換えウイルスベクタープラスマドを上記パッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平2-227075]、リポフュクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

上述した組換えウイルスベクターは、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して心筋形成剤を製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。上記の心筋形成剤は、液体の場合はそのままで、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して遺伝子治療に使用することができる。本発明の心筋形成剤の投与方法は、患者の治療部位の心筋に吸収されるように、カテーテル等を用いて局所的に投与する方法等が用いられる。

上述した組換えウイルスベクターは試験管内で該心筋細胞への分化能を有する細胞に感染させた後、上述した心筋形成剤として調製し、患者に投与することができる。または、組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することもできる。

## (2) 蛋白質を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子蛋白質を有効成分とする場合の調製法について述べる。

心筋分化誘導因子蛋白質の完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、あるいは完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換発現ベクターを造成する。

該組換発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とする DNA を発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア(Escherichia)属、セラチア (Serratia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、バチルス (Bacillus) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属等に属する細菌、クルイベロミセス (Kluyveromyces) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、トリコスporon (Trichosporon) 属、シワニオミセス (Schwanniomyces) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、心筋分化誘導因子蛋白質の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、心筋分化誘導因子蛋白質をコードする DNA および転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pSE280(Invitrogen 社製)、pGEMEX-1(Promega 社製)、pQE-8(QIAGEN 社製)、pKYP10[特開昭 58-110600]、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)(Stratagene 社製)、pGEX(Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pET-3(Novagen 社製)、pTerm2(USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]等を例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したものを用いることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター( $P_{trp}$ )、lac プロモーター( $P_{lac}$ )、 $P_L$  プロモーター、 $P_R$  プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、

SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター(P trp x2)、tacプロモーター、letIプロモーター[Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子DNAの蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子DNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、

Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3(ATCC37115)、YEpl24(ATCC37051)、YCpl50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロ

ロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF  $\alpha$  1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスporon・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNA1(Invitrogen 社製)、pCDM8(Invitrogen 社製)、pAGE107[特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3(特開平 2-227075)、pCDM8[Nature, 329, 840 (1987)]、pCDNA1/Amp(Invitrogen 社製)、pREP4(Invitrogen 社製)、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒト CMV)の IE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR  $\alpha$  プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637[特開昭 63-299] 等をあげることができる。

組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポーレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等を用いることができる。形質転換体の取得および培養

は、特開平 2-227075 号公報あるいは特開平 2-257891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サップルメント 1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII(ともに Invitrogen 社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

心筋分化誘導因子をコードする DNA を組み込んだ組換え体 DNA を保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に心筋分化誘導因子蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、心筋分化誘導因子蛋白質を製造することができる。

心筋分化誘導因子蛋白質を製造する形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化合物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパンノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーピリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は 15 ~40°C がよく、培養時間は、通常 16 時間~7 日間である。培養中 pH は、3.0~9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル

– β – D – チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地[Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地[Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常 pH6~8、30~40°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地(Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地(Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405(いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium[Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30°C 等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上述の形質転換体の培養物から、心筋分化誘導因子蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、心筋分化誘導因子蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモグナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)–セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Amersham Pharmacia Biotech 社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィ

ニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

心筋分化誘導因子蛋白質またはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質またはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 5、6、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国 Advanced ChemTech 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、米国 Protein Technology Instrument 社製、米国 Synthecell-Vega 社製、米国 PerSeptive 社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用して合成することもできる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質は、上記(1)と同様にして心筋形成剤を形成し使用することができる。

## 7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

心不全をおこす疾患の中には、一部であるが单一遺伝子の変異により、本来心臓の分化または維持に必要な蛋白質の一部が欠損するために心不全となる一群がある。このような疾患としては、家族性肥大型心筋症、Fabri 病、QT 延長症候群、マルファン症候群、大動脈弁狭窄症、ミトコンドリア心筋症、Duchenne 型筋ジストロフィー症等があげられる。これらの疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性 Na チャンネル、K チャンネル、

フィブリン、エラステイン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている[治療学, 30,1302–1306(1996)]。

上記疾患患者を治療する方法としては、疾患患者より本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を取得し、該細胞に正常な遺伝子を導入したのち、心臓に移植すること方法があげられる。正常な遺伝子は、上記6(1)で記載した遺伝子治療用のベクターに挿入したのちに、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することができる。

#### 8. 心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な表面抗原を特異的に認識する抗体の取得

以下に、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体の調製法について述べる。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、心筋梗塞などの心臓病の細胞治療を実施する上で必要な心筋細胞への分化能を有する細胞の純度検定や精製に用いることができる。

該抗体を取得する方法として、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞  $3 \sim 5 \times 10^5$  cells／匹、あるいは該細胞から調製した細胞膜画分 1～10mg／匹程を抗原として、ウサギ、ヤギまたは3～20週令のラット、マウスもしくはハムスター等の非ヒトほ乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイントの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA 法)：医学書院刊 1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹

水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株であるP3-X63Ag8-U1(P3-U1)株[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株[European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株[J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株[Nature, 256, 495 (1975)]等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノブテリンを加えた培地)に懸濁したのち、7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲルfiltrationカラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

上記方法で取得した、該心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と造血系幹細胞、神経系幹細胞などの対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記特異的表面抗原を発現しているかどうかを容易に検定することができる。

## 9. 心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコードする遺伝子の取得

該心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する

方法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738–5742 (1988)]やRepresentational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640–5648 (1994)]による方法をあげることができる。

まず、心筋細胞への分化能を有する細胞より作製した cDNA ライブラリーを、造血系幹細胞や神経系幹細胞などの心筋細胞への分化能を有する細胞以外の対照細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う。心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な遺伝子を濃縮した差分化 cDNA ライブラリーを調製した後、該差分化 cDNA ライブラリーの挿入 cDNA 配列を 5' 末端側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列を持つものだけを選択する(ランダム配列解析)。このようにして得られた cDNA の全長塩基配列を決定することにより、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンストラップ法も用いることもできる[Science, 261, 600–603 (1993); Nature Biotechnology, 17, 487–490 (1999)]。シグナルシーケンストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンストラップライブラリーをサブトラクションが行えるベクターを用いて作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞から作製したシグナルシーケンストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含む DNA 断片は全長 cDNA をクローン化するためのプローブとして用いることができる。

全長 cDNA はその全長塩基配列を解析することで、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体を取得することができる。

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがある。このような受容体は心筋

細胞への分化能を有する細胞の特異的な増殖、または心筋細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質の場合、直接心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

#### 10. 心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング

心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング方法としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を無血清培地で培養させる際に、検体となる種々の物質を添加させ、該細胞が増殖するか、または心筋細胞へ分化誘導されるかで調べることにより行うことができる。

検体となる物質としては、各種サイトカインや増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液等などいかなるものでもよい。

増殖能力はコロニー形成能や BrdU の取り込みなどで調べることができる。

コロニー形成能は、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

BrdU の取り込みは、BrdU を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

心筋細胞への分化を評価する方法としては、細胞の自律拍動を指標とする方法、細胞内に導入したレポーター遺伝子の発現を指標とする方法などがあげられる。

レポーター遺伝子の発現を指標とする方法は、心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNAを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入し、該細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を調べる方法である。

レポーター遺伝子としては、GFP(Green fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、ベーターガラクトシダーゼをコードする遺伝子などがあげられる。

心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、cardiac troponin I(cTNI)があげられる[J. Biological Chemistry, 273, 25371-25380 (1998)]。

#### 11. 心筋細胞への分化能を有する細胞の不死化

心臓疾患の患者、特に高齢者に対して本発明の治療薬を投与する場合、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法をあげることができる。

テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法としては、テロメラーゼの触媒サブユニットである TERT 遺伝子、具体的には配列番号 32 で表される DNA を、レトロウイルスベクターに導入し、該ベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法、心筋細胞への分化能を有する細胞に内在する TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を心筋細胞への分化能を有する細胞に投与する方法、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子をコードする DNA を含むベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法などをあげることができる。

上述の TERT 遺伝子を誘導発現させる因子は、TERT 遺伝子プロモーターと GFP(Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、あるいはベーターガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することにより、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を選別することができる。

## 12. 心筋細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法

生体内から取り出した各種組織から目的の表面抗原を発現している細胞を取得する方法としては、ソーティング機能を有したフローサイトメーターを用いる方法、磁気ビーズを用いる方法があげられる。

フローサイトメーターのソーティングの方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャ方式などがあげられる(フローサイトメーター自由自在、p14-23、秀潤社、1999年)。どちらの方法も、細胞の表面に発現している分子に結合した抗体から発せられる蛍光強度を電気信号に変換することにより抗原の発現量を定量することができる。また、使用する蛍光の種類を組み合わせることで、複数の表面抗原を利用して分離することも可能である。蛍光としては、FITC(fluorescein isothiocyanate)、PE(phycoerythrin)、APC(Allo-phycocyanin)、TR(TexasRed)、Cy3、CyChrome、Red613、Red670、PerCP、TRI-Color、QuantumRed などがあげられる(フローサイトメーター自由自在、p3-13、秀潤社、1999年)。

染色方法としては、生体内から取り出した各種組織、具体的には骨髓または臍帯血から、遠心分離などの方法で細胞を分離したのち、直接抗体で染色する方法、一度適当な培地中で培養・増殖を行った後に抗体で染色する方法があげられる。

細胞の染色はまず、表面抗原を認識する一次抗体と目的の細胞サンプルを混合し、氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。一次抗体が蛍光で標識されている場合には、洗浄後フローサイトメーターで分離を行う。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、洗浄後一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された二次抗体と一次抗体が反応した細胞とを混合し、再び氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。洗浄後、一次抗体と二次抗体で染色された細胞をフローサイトメーターで分離を行う。

磁気ビーズを用いる方法では、目的の表面抗原を発現している細胞を大量に分離することができる。分離の純度は上述のフローサイトメーターを用いる方法には及ばないが、精製を繰り返すことにより、十分高い細胞純度を確保することができる。

細胞に一次抗体を反応させた後、細胞と反応しなかった一次抗体を除去し、一次抗体と特異的に結合する磁気ビーズを結合させた二次抗体を結合させる。残存する二次抗体を洗浄除去した細胞は磁石を設置したスタンドで分離することができる。これらの操作に必要な材料および装置は DYNAL 社から入手することができる。

磁気ビーズを用いる方法は、細胞サンプル中より不要な細胞を除去するのにも同様に利用することができる。不要な細胞をより効率的に除去するには Stem Cell Technologies Inc(Vancouver, Canada)より販売されている StemSep 法を用いることができる。

上述の方法で用いられる抗体としては、前記8で取得された抗体、または造血系細胞の表面抗原である CD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c、Ly6g を認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、CD31、CD105、CD144 を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原である CD140 を認識する抗体、インテグリンの表面抗原である CD49b、CD49d、CD29、CD41 を認識する抗体、マトリックス受容体である CD54、CD102、CD106、CD44 を認識する抗体があげられる。これらの抗体を組み合わせることで、より高い純度で目的の細胞を取得することができる。

具体的には、CD34 陰性、CD117 陽性、CD144 陰性細胞および CD140 陽性の性質を有する細胞を取得するには、ヒト骨髓細胞から CD34 陽性細胞と CD144 陽性細胞を上述した

免疫磁気ビーズの方法などを利用して除去した後、CD117陽性およびCD140陽性の細胞画分を分取することで目的の細胞を分離することができる。

### 13. 心筋特異的な遺伝子のプロモーターレポーターべクターを用いた心筋前駆細胞の分離

心筋細胞への分化能を有する細胞から誘導した心筋細胞または心筋細胞の前駆細胞を効率的に分離するために、発光オワンクラゲの緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein; GFP)を遺伝子導入のためのレポーター遺伝子の指標として用いることができる。

具体的には、心筋細胞で特異的に発現している遺伝子または前記9項で取得した心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子をつなないだベクターを作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する。このようなレポーターべクターを導入された細胞を薬剤耐性などの指標で分離後、心筋細胞へと分化誘導する。分化誘導した細胞は GFP を発現し、蛍光を発生する。蛍光を発生した心筋細胞ならびに心筋前駆細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離することができる(フローサイトメーター自由自在、p44-52、秀潤社、1999年)。

心筋細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターとしては MLC2v やトロポニンI を用いることができる。

ベクターとしては、上述した動物細胞用のプラスミドベクター、アデノウイルスベクターなどを用いることができる。

### 14. 心筋細胞への分化能を有する細胞から各種細胞への分化の誘導

#### (1) 心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化を誘導する方法としては、核内受容体 PPAR- $\gamma$  を活性化する因子を  $0.4 \mu M$  から  $2 \mu M$  の終濃度となるよう培地中に添加する方法が挙げられる。核内受容体 PPAR- $\gamma$  の活性化因子としては、トログリダゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾン等のチアジリジオン骨格を有する化合物をあげることができる。

または、培養皿一面に密集した細胞の培地中に、終濃度が  $1 \mu M$  dexamethasone、 $0.5 mM$  methyl-isobutylxanthine、 $0.01 mg/ml$  insulin、 $0.2 mM$  indomethacin となるように、それぞれを添加した培地で培養する方法も挙げられる。

#### (2) 心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化を誘導する方法としては、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  個の細胞を遠心分離して得られた凝集塊に、終濃度が  $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるような TGF  $\beta$  3 を含む培地で培養する方法が挙げられる。

### (3) 心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化を誘導する方法としては、細胞の培地中に終濃度  $0.1 \mu\text{M}$  dexamethasone、 $0.05 \text{ mM}$  ascorbic acid-2-phosphate、 $10 \text{ mM}$   $\beta$ -glycerophosphate となるように、それぞれを添加した培地中で培養する方法が挙げられる。

#### 15. Hoechst 33342 を用いた心筋細胞への分化能を有する細胞の分離

Hoechst 33342 は DNA 結合色素であり、生きたままの細胞を染色することができる。骨髓細胞の大多数は激しく分裂しているため、非常に明るく染色されるが、未熟な細胞ほど暗く染まる。これは、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターによる色素排除能力が未熟な細胞ほど大きいことが知られている (中内啓光、蛋白質核酸酵素、Vol.45, No.13, 2056–2062, 2000)。従って、Hoechst 33342 を取り込まない細胞を分離することにより、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離することができる。

骨髓中から Hoechst 33342 で暗く染まる細胞を分離するには、骨髓細胞を Hoechst 33342 で染色した後、FACS を用いて UV レーザーをあてて短波長と長波長の 2 重染色を行うことにより解析を行うことができる。Hoechst 33342 を取り込まない未熟な細胞は Side population として分画することができる [Goodell, MA et al. J.Exp.Med., 183, 1797–1806 (1996)、[http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new\\_site/index2.html](http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/index2.html)]。

#### 図面の簡単な説明

図1は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD105 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図2は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス Flk1 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は

陰性対象の結果である。

図3は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD31 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図4は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図5は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD34 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図6は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD117(c-kit)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図7は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD14 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図8は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図9は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線

は陰性対象の結果である。

図10は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図11は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図12は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図13は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図14は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図15は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図16は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、

実線は陰性対象の結果である。

図17は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図18は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図19は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図20は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

以下に実施例をあげて、本発明を具体的に示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例1. マウス骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5週齢の C3H/He マウス 10 匹をエーテルを用いて麻酔し、そのうえで頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを充分かけ消毒した。

次に大腿骨周辺の皮膚を広い範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大殿四頭筋をはさみで切除した。膝関節の部分に軽くはさみを入れ、関節を外し、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみを入れ関節を外し、大腿骨を取り出した。大腿骨に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製 23G の針を装着した 2.5ml 注射器に 20%FCS を含有する IMDM 培地を約

1.5ml 入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髓細胞を押し出した。取得した細胞は、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。継代を続けることで、細胞は間葉系の細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

約4ヶ月上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により 192 種類の独立した単一細胞(single cell)由来の細胞株を樹立した(以下、骨髓由来初代不死化細胞株と称する)。これら独立のクローン由来の細胞にそれぞれに 3 μ M の終濃度になるように 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2 週間培養することで拍動する細胞を産生するクローンを選択した。骨髓由来初代不死化細胞 192 個のうち、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は 3 個であった。このうちの 1 つが KUM2 である。以後、骨髓細胞 KUM2 ならびに後述する多分化能幹細胞 BMSC は特別な指定がない限り、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。KUM2 細胞は 3 μ M の終濃度の 5-aza-C に 24 時間曝露することで、非特異的に自己拍動する心筋細胞が分化誘導してくるが、その頻度は非常に低かった(10<sup>7</sup> cell に 1 つ以下)。

しかし、KUM2 細胞から出現する自己拍動する細胞周辺をクローニングシリジで採取すると、増殖能の高い多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)と、限られた回数のみ増殖し心筋細胞へと分化する細胞(以下、単に心筋前駆細胞と称する)の少なくとも 2 種類の細胞が観察された。BMSC 細胞は、クローニングシリジで回収した後、細胞を継代培養し、不死化する細胞を選別することで、クローン化を行った。BMSC 細胞は、その親株となる KUM2 よりも 100 倍以上効率的に分化誘導することが観察された。また心筋前駆細胞は再び 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2~3 週間培養することで多くの自律拍動する細胞が効率的に出現した。該心筋前駆細胞は、増殖条件下では、单核の線維芽細胞様の形態を呈し、心筋収縮蛋白質はほとんど発現していない。しかし 5-aza-C により最終分化を誘導すると形態は著しく変化した。

分化誘導 1 週間目頃より、一部の細胞は細胞質が大きくなり円形あるいは棒状を呈し、後に自律拍動を開始する細胞となるが、この時点では自律拍動を行うことは少なかった。分

化誘導後2週間になると、自己拍動を開始した。この自己拍動した細胞は互いに連結しない、縦に連結して筋管細胞様となった。3週間以後には多くの細胞が縦に1列にならび、同期して収縮した。分化後4週間以後には培養皿の上の直接連結される細胞は、すべて同期して収縮し心筋組織様になった。マウスの心臓は、毎分300～400回程度の心拍数で収縮するが、これに対してマウス成体骨髓由来の細胞より分化した心筋細胞は、培養条件下において毎分120～250回の速さで規則的に収縮した。

#### 実施例2. マウス骨髓細胞から誘導される心筋細胞の特性

骨髓由来細胞から形成される自律拍動する心筋様細胞が、実際に心筋細胞の性質を保有しているかどうかの解析を行った。

実施例1で取得した、骨髓由来初代不死化細胞株、マウス骨髓由来多分化能幹細胞BMSC および心筋前駆細胞から分化誘導した心筋細胞から、それぞれ Trizol Reagents(GIBCO BRL 社製)を用いて全 RNA を取得した。次に、該全 RNA を基質として SuperscriptII reverse transcriptase(GIBCO BRL 社製)を用いて First strand cDNA を合成した。

次に、心筋細胞特異的な遺伝子の発現を検討するために、該 First strand cDNA を基質として、配列番号33～58に示した塩基配列を有する合成DNAを用いて定量的PCRを行った。心筋細胞特異的な遺伝子としては、ナトリウム利尿ペプチドであるANP およびBNP、ミオシン重鎖である $\alpha$ -MHC および $\beta$ -MHC、アクチンである $\alpha$ -skeletal actin および $\beta$ -skeletal actin、ミオシン軽鎖であるMLC-2a、MLC-2v、心筋細胞特異的転写因子であるNkx2.5/Csx、GATA4、TEF-1、MEF-2C、MEF-2D、MEF-2Aを用いた。

ANP の増幅には配列番号33、34の塩基配列を有する合成DNAを、BNP の増幅には配列番号35、36の塩基配列を有する合成DNAを、 $\alpha$ -MHC の増幅には配列番号37、38の塩基配列を有する合成DNAを、 $\beta$ -MHC の増幅には配列番号39、40の塩基配列を有する合成DNAを、 $\alpha$ -skeletal actin の増幅には配列番号41、42の塩基配列を有する合成DNAを、 $\beta$ -skeletal actin の増幅には配列番号43、44の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2a の増幅には配列番号45、46の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2v の増幅には配列番号47、48の塩基配列を有する合成DNAを、Nkx2.5/Csx の増幅には配列番号49、50の塩基配列を有する合成DNAを、GATA4 の増幅には配列番号51、52の塩基配

列を有する合成 DNA を、TEF-1 の増幅には配列番号 53、54 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2C の増幅には配列番号 55、56 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2D の増幅には配列番号 57、58 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2A の増幅には配列番号 59、60 の塩基配列を有する合成 DNA を用いた。

生体内で分化誘導する心筋細胞は、心筋収縮の心拍数またはエネルギー効率に違いを持たせるために、胎児期、新生児期あるいは成熟期によって、または心房筋あるいは心室筋の相違によって、心筋収縮蛋白質のアイソフォームに違いがある。

培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞の場合、アイソフォームの発現様式は  $\alpha$ -アクチンの場合は骨格筋型のほうが心筋型より多く発現し、ミオシン重鎖の場合は  $\beta$  型のほうが  $\alpha$  型よりも多く発現していた。ミオシン軽鎖では 2v 型が発現しているのに対し、2a 型の発現は観察されなかった。

また、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞の分化誘導後には、ナトリウム利尿ペプチドである ANP および BNP の発現が見られた。以上の心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞の表現型は胎児型心室筋細胞の形質を有すると考えられる。

培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞では、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2C、MEF-2D、TEF-1 遺伝子の発現が観察された。増殖中の骨髓由来初代不死化細胞株ではこれらの転写因子の発現は認められなかつたが、増殖中の骨髓由来心筋前駆細胞では Nkx2.5/Csx、GATA4 および MEF-2C の発現が観察され、心筋細胞への分化誘導に伴い、遅れて MEF-2A および MEF-2D の発現誘導が観察された。

次に、ガラス微少電極により、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞の活動電位を記録した。活動電位は、細胞を 1.49mM CaCl<sub>2</sub>、4.23mM KCl、25mM HEPES(pH7.4)を添加した IMDM 培地中で培養し、Diaphoto-300 実体顕微鏡(ニコン社製)下、温度 25°C で測定した。ガラス電極は電極抵抗を 15~30 Ω に設定して 3M KCl を充填した。膜電位の測定は MEZ-8300(日本光電社製)を用いて電流クランプモードで行った。測定結果は RTA-1100M(日本光電社製)を用いて熱感紙に記録した。その結果、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞は、洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類が観察された。両者に共通する活動電位の特徴は、①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位を持つこと

と、③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また、心室筋細胞型では活動電位は Peak&Dome 型(活動電位第1相を持つ)を呈した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋細胞型ではこれに比べて、静止期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後、2～3週間の細胞はすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後4週間頃より心室筋細胞型が観察され時間経過とともに次第に増加した。

### 実施例3. サイトカインを用いた心筋細胞への分化の促進

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の心筋分化誘導率を増加させるため、5-aza-C で分化誘導をおこなう際に、各種サイトカインを添加して誘導率が増加するかどうか解析をおこなった。

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュあるいは 60mm フィブロネクチン付着ディッシュ(fibronectin-coated dish:Becton Dickinson 社製)に蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μM となるよう添加した上で、更に、PDGFのみ添加(培養ディッシュA)、PDGF とレチノイン酸の両方添加(培養ディッシュB)、添加なし(培養ディッシュC)の 3 種類の異なる処理を行い培養を継続した(終濃度は PDGF は 10ng/ml、レチノイン酸は 10<sup>-9</sup>M)。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュAには PDGF を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュBには PDGF を終濃度 10ng/ml とレチノイン酸を終濃度 10<sup>-9</sup>M になるように添加した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と PDGF あるいはレチノイン酸の添加を行った。

薬剤を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、PDGF を添加すると約4割、PDGF とレチノイン酸を同時に添加すると約 5 割の細胞が筋管様細胞となつた。また、フィブロネクチン付着ディッシュの3群では、培養ディッシュの3群に比べて、筋管様細胞になる細胞数が約 1 割程度ずつ増加した。

得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的PCRを解析したところ、PDGFあるいはレチノイン酸は骨格筋に関係するMyoD、fTnI遺伝子の発現を亢進するが、心筋に特異的に関係するcTnI、ANPの発現は誘導しなかった。

次に、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)を $2 \times 10^4$ 細胞/mlとなるように60mm培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に5-aza-Cを終濃度3μMとなるよう添加した上で、更に、FGF-8を終濃度10ng/mlとなるように添加(培養ディッシュD)、ET-1を終濃度10ng/mlとなるように添加(培養ディッシュE)、Midkineを終濃度10ng/mlとなるように添加(培養ディッシュF)、BMP4を終濃度10ng/mlとなるように添加(培養ディッシュG)、添加なし(培養ディッシュH)の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日5-aza-Cを培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュDにはFGF-8を終濃度10ng/mlとなるように添加し、培養ディッシュEにはET-1を終濃度10ng/mlとなるように添加、培養ディッシュFにはMidkineを終濃度10ng/mlとなるように添加、培養ディッシュGにはBMP4を終濃度10ng/mlとなるように添加して培養を継続した。それから更に2日後、4日後にも同様の培地交換とFGF-8、ET-1、MidkineあるいはBMP4の添加を行った。

5-aza-Cを加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-Cのみを添加した培養ディッシュでは約3割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8、ET-1、MidkineあるいはBMP4を添加した培養ディッシュでは約5割の細胞が筋管様細胞となった。

得られた、筋管様細胞からRNAを回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的PCR解析を行ったところ、FGF-8、ET-1、MidkineあるいはBMP4は、それぞれ単独で心筋に特異的な遺伝子であるcTnI、ANPの発現を亢進することが観察された。

#### 実施例4. DMSOを用いた骨髓由来幹細胞からの心筋細胞への分化誘導

実施例1に示した方法により、取得した心筋細胞への分化能のあるマウス骨髓由来多分

化能幹細胞(BMSC)に  $3 \mu M$  の 5-aza-C の代わりに  $10 \mu M$  の DMSO を添加し24時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えて、さらに6週間培養を続けた。

その結果、拍動する心筋細胞が分化誘導されることを見出し、これらの細胞には Nkx2.5/Csx および GATA4 遺伝子が発現しており、5-aza-C を添加したときと同様の性質を有した心筋細胞であることが示された。この解析結果は、5-aza-C と DMSO の共通の機能である染色体 DNA の脱メチル化が心筋細胞の分化に必要であることを示している。

実施例5. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞が多分化能を有する幹細胞および心筋前駆細胞であることの証明

マウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)から分化誘導する拍動細胞が心筋細胞の性質を保有していることは示されたが、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)に、心筋前駆細胞が存在しているのか、より未分化で心筋細胞以外の、例えば脂肪細胞などに分化可能な幹細胞が存在するかを調べるために、シングルセル・マークィング(Single cell marking)の実験を行った。

具体的には、分化誘導を行う前に、ある1つの細胞に GFP 遺伝子をウイルスベクターを導入して標識し、その後分化誘導させて標識した細胞がどのような細胞に分化したかで判断した。

まず、GFP 遺伝子を発現させるレトロウイルスベクタープラスミド GAR3-GFP および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクターを、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

この DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釀で 10cm ディッシュに継代し、一晩  $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$  濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。

トランスフェクションは以下の通りに行った。

GAR3-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA  $15 \mu g$  と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA  $5 \mu g$  を  $250mM CaCl_2$  (pH6.95)  $0.5ml$  に加えて溶解させ、その溶液を  $15ml$  のチューブに入れた  $2 \times BBS$  [ $50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)$ 、 $280mM NaCl$ 、 $1.5mM Na_2HPO_4$  (pH6.95)]  $0.5ml$  に滴下して 10 分間室温で静置させた。そ

の後、このDNA溶液を、前日に用意した293細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して2日後に、培養上清を0.45 μ mのフィルター(Millipore社製)でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。この溶液をIMDM培地で10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>に希釈した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞は、ウィルスをインフェクションさせる前日に2×10<sup>4</sup>細胞／ウェルとなるように6ウェル・ディッシュに蒔いた。

希釈した、ウィルスベクターを含む溶液には、終濃度8 μ g/mlとなるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)の培養上清2mlをウイルス液2mlと置換し、33°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。5時間後、培養上清を新しいIMDM培地に交換し、更に33°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2日間培養を行った後、蛍光顕微鏡下でGFPを発現している細胞を観察し、細胞1000個あたり1つのGFP陽性細胞があるような細胞群を得た。

該細胞を8×10<sup>3</sup>細胞／ディッシュとなるよう、35mmガラスベースディッシュ(旭テクノグラス社製)に蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、5-aza-C(Sigma社製)、PDGF-BB(Peprotech社製)、all transレチノイン酸(Sigma社製)をそれぞれ終濃度3 μ M、10ng/ml、10<sup>-9</sup>Mとなるよう添加し、添加して2日後および4日後には、培地交換を行うとともに、再度PDGF-BB(以降PDGFと略す)、all transレチノイン酸を上述と同じ濃度で添加した。

4週間後、蛍光顕微鏡でGFP陽性細胞がどのように分化したかを観察すると、心筋細胞のみがGFP陽性になっている細胞集団、心筋細胞と未分化幹細胞がGFP陽性になっている細胞集団、ならびに心筋細胞、脂肪細胞および未分化幹細胞の3者がGFP陽性になっている細胞集団の3種類の細胞集団が見られた。すなわち、多分化能幹細胞から心筋前駆細胞が確率的(stochastic)に分化誘導していくことが明らかとなった。またこの結果は、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞には多分化能を有する幹細胞が存在する

ことを示した。

#### 実施例6. 転写因子の強制発現による心筋細胞分化の促進

マウス心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)に心筋細胞分化に関する転写因子を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

具体的には、分化誘導を行う前に、Nkx2.5/Csx または GATA4 遺伝子をウイルスベクターを用いて導入して、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

まず、Nkx2.5/Csx を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)に Nkx2.5/Csx を組み込み、pCLNC-Nkx2.5/Csx を調製した。

また、GATA4 を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)の G418 耐性遺伝子部分をピューロマイシン耐性遺伝子に置換したプラスミド pCLPCX に、GATA4 を組み込み、pCLPC-GATA4 を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-Nkx2.5/Csx と pCLPC-GATA4 および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社)を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晩 37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-Nkx2.5/Csx あるいは pCLPC-GATA4 レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクターDNA 5 μ g を 250mM CaCl<sub>2</sub> (pH 6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、

ウィルスベクターを含む溶液を回収した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)は、ウィルスをインフェクションさせる前日に  $2 \times 10^4$  細胞／ウェルとなるよう6ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウィルスベクターを含む溶液に、終濃度  $8 \mu \text{g/ml}$  となるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma 社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓由来多分化能幹細胞(BMSC)の培地と置換し、 $33^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5時間後、新しいIMDM 培地に交換し、更に  $33^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  濃度の孵卵機を用いて培養を行い、さらに2日間培養を行った。

その後、pCLNC-Nkx2.5 と pCMV-Eco 導入で產生されたウィルスをインフェクションした細胞には、G418 を終濃度  $300 \mu \text{g/ml}$  になるように添加し、さらに7日間培養した。

一方、pCLPC-GATA4 と pCMV-Eco 導入で產生されたウィルスをインフェクションした細胞には、ピューロマイシンを終濃度  $300\text{ng/ml}$  になるように添加し、さらに7日間培養した。

どちらの細胞も、この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして、取得した Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の安定形質転換細胞について、上記実施例3の方法により分化誘導を行い、心筋細胞への分化の効率を検定した。

Nkx2.5/Csx を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5)と GATA4 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-GATA4)を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、 $33^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度  $3 \mu \text{M}$  となるよう添加した。さらに24時間、 $33^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに4週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現によっては大きく変化しなかった。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71～78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnl, ANP の発現を亢進することが観察された。

次にまず、Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を同時に心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLPC-GATA4 を、上述した方法に従い、組み換えウイルスを生産し、Nkx2.5/Csx を強制発現させた心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5)に感染させた後、300ng/ml の終濃度になるようにピューロマイシンを添加し、薬剤耐性クローン(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を取得した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μM となるよう添加した。さらに 24 時間、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに 4 週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子の強制発現によっては大きく変化しなかったが、拍動する心筋細胞の数は両遺伝子を強制発現していない心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞と比較して 50 倍以上増加した。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71～78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx と GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnI, ANP の発現を亢進することも観察された。

#### 実施例7. 転写因子の強制発現とサイトカインの組み合わせによる心筋細胞分化の促進

上述した心筋分化促進能のある転写因子(Nkx2.5/Csx, GATA4)とサイトカイン(FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4)を組み合わせることによる、心筋細胞分化に及ぼす影響を解析した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養デ

イッシュI)、ET-1を終濃度 10ng/ml になるように添加 (培養ディッシュJ)、Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加 (培養ディッシュK)、BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加 (培養ディッシュL)、添加なし(培養ディッシュM)の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュIには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュJには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュKには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュLには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。一方、拍動する心筋の数は FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加により増加しなかった。

次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71～78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 は Nkx2.5/Csx と GATA4 の強制発現により促進される cTnI, ANP の発現をさらに亢進することはなかった。

#### 実施例8. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の心臓への移植

心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞が生体内で心筋に分化し心臓に定着するかどうかを明らかにするために、実施例5で作製した、GFP で標識した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-GFP)を、マウスへ移植するためのドナー細胞とした。具体的には、以下の方法を実施した。GFP で標識した BMSC 細胞を予め 5-aza-C で 24 時間処理した後、 $1 \times 10^8$ cells/ml となるよう PBS に懸濁し、移植直前まで氷上で保存した。なお、BMSC 細胞は 0.05%エリスロシン染色により 95%程度生存していることを確認している。

一方、レシピエントの C3H/He マウス(日本チャールズリバー社製)は、エーテルを用いて麻酔の導入を行い、テルモ製のテルモシリソジ(1ml)を用いてチオペンタール 30mg の腹腔

内投与することで麻酔の維持を行った。マウスの四肢をテープでコルク板に固定し、さらに首が反り返るように上顎をゴムでコルク板に固定した。この時点で左右の上肢及び右下肢に心電図電極を刺入し心電図のモニタリングを行った。続いて、メーヨ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NK-174-14)で頸部を気管にそって1 cmほど切開し、白十字社のベビーコットン棒で甲状腺を左右に剥離をし、気管周囲の筋肉をマイクロ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NY-334-08)で切開し気管を露出した。ついでマイクロフェザー(メス)で気管を1mmほど切開しここからJ型に変型させたテルモ製サーフローフラッシュ(22G)の針を挿入し口腔から外に出し、この針をガイドにサーフローフラッシュ(20G)の外筒を気管内に挿入した。この外筒にレスピレータ(シナノ製作所製の MODEL SN-480-7)をつなぎ 100 パーセント酸素を 1ml/分で流し、一回換気量は 1ml、呼吸回数は 120/分で人工呼吸を開始した。このときにガイド針を挿入した穴からエアーがもれるので気管周囲の皮膚をモスキート鉗子(NONAKA RIKAKI CO.,LTD)を用いて気管をおおうようにして閉鎖した。つぎに、胸骨柄より頸部に向かい 2cmほどメーヨ剪刀で切開、ついで胸骨を 2cmほど胸骨柄から頸部に向かい切開をした。出血をバイポーラの電気メスで止血し、テルモ製のテルモシリジ(1ml)にジーエルサイエンス社製の 30G の針(メタルハブ交換針 N730)をつけて心尖部にドナー細胞を PBS に浮遊した液体を 0.1ml 注入した。ついで ETHICON 社製の 4-0 ETHIBOND X761 を用いて胸骨の閉鎖、皮膚の閉鎖を行い、同じ針糸で頸部の皮膚の閉鎖をした。自発呼吸の出現を確認しレスピレータをはずしインファントウォーマーを 37°C に加熱しこの中で覚醒を待った。なお本実験の操作は DESIGN FOR VISON 4.5 × SURGICAL TELESCOPES を用いて行った。

移植して77日後のマウスから組織を摘出し、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。包埋した組織サンプルをミクロトームで  $6 \mu\text{m}$  の厚さに薄切りし、予め poly-L-lysine でコーティングしておいたスライドグラス上に貼り付けた。100%キシレンに浸して脱パラフィンをした後、エタノールで洗浄し、更に 0.3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液に 30 分間浸して抗体反応の前処理をおこなった。

その後、PBS で洗浄したサンプルに対し、5%正常ブタ血清溶液を 30 分間反応させ、ブロッキングをおこなった。ブロッキング後、PBS で洗浄し、PBS で 100 倍に希釈したマウス抗 GFP モノクローナル抗体(CLONTECH 社製)で 4°C に一晩置き、抗体反応をおこなった。P.

BSで洗浄後、パーオキシダーゼ標識デキストラン結合ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体(DACO 社製)を室温で 30 分間反応させた。更に PBS で洗浄後、発色液[10  $\mu$  g/ml 3、3'-Diaminobenzidine(DAB) Tetrahydrochloride]、0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.05M Tris-HCl(pH6.7)]を添加して10分間程度反応をおこない、PBSで洗浄して反応を停止させた。更に、そのスライドグラスに対して、メチルグリーン染色もおこなった。

一方、組織切片の形態を明らかにするため、連続切片の一部をヘマトキシリソ・エオジンで染色した。

その結果、心筋細胞および血管内皮細胞において、GFP 抗体陽性細胞が見られた。従って、マウス骨髓細胞は、移植により心筋細胞および血管内皮細胞に分化したといえる。

#### 実施例9. 培養心筋細胞由来の因子による骨髓細胞の心筋分化促進

実施例8で示したように、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC)を心臓に移植することで心筋への分化が観察された。この結果は、心筋細胞自身が骨髓細胞を心筋細胞へ分化誘導する因子を発現している可能性を示唆している。この仮説を検証する目的で妊娠 16 日目の C3H/He マウスから胎児心臓を摘出し、公知の方法(心臓血管研究方法の開発。江橋節朗編集、学会出版センター発行、1983)に従って、心筋細胞の初代培養細胞を樹立した(以後、培養心筋細胞と称する)。

まず、培養心筋細胞から分泌される因子に心臓分化を促進させる活性があるかどうかを検証するために、培養心筋細胞を 6cm の培養ディッシュに  $5 \times 10^6$  cells を 72 時間培養した後、培養上清を 0.45  $\mu$  m のフィルター(Millipore 社製)でろ過し、ろ過した培養上清と等量の培地を加えて、培養心筋細胞から分泌される因子を含む培養液(以後コンディションド・マイディアムと称する)を調整した。

あらかじめ心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 6cm の培養ディッシュに  $1 \times 10^5$  細胞となるよう培養し、その後コンディションド・マイディアムと培地を置換した。このとき同時に 5-aza-C を終濃度 3  $\mu$  M になるように添加した。翌日、培地を新しいコンディションド・マイディアムに交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に一度培地を新しいコンディションド・マイディアムと交換した。その結果、コンディションド・マイディアムの添加により、心筋細胞への分化能を有する骨髓幹細胞(BMSC)

からの筋管様細胞の増加は観察されなかつたが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)はコンディションド・マイディアムの添加により、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかつた。

次に、心筋細胞が発現している細胞外基質(ECM)に心筋分化促進活性があるかどうかを検証するために、心筋細胞を培養した培養ディッシュから 0.45%のトリプシン・EDTA を 30 分間程度処理することで心筋細胞を除去し、培養心筋細胞の細胞外基質をコートした培養ディッシュ(以後 ECM コート・ディッシュと称する)を作製した。次に、この 6cm の ECM コート・ディッシュ上に心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を  $1 \times 10^5$  細胞となるよう培養し、その後 5-aza-C を終濃度  $3 \mu M$  になるように添加した。翌日、5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培地を新しいものに交換した。心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC)は ECM コート・ディッシュにより筋管様細胞の数は増加しなかつたが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)は ECM コート・ディッシュにより、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかつた。

次に、 $2 \times 10^4$  個の培養心筋細胞と、 $8 \times 10^4$  個の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC)または  $8 \times 10^4$  個の Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)とを 6cm の培養ディッシュで共培養を行つた。培養心筋細胞と骨髓細胞を識別するために、2 種類の骨髓細胞(BMSC と BMSC-Nkx2.5-GATA4)は実施例 5 で示した方法により GFP で標識したものを利用した。共培養を開始した翌日に 5-aza-C を終濃度  $3 \mu M$  になるように添加し、その翌日に 5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培

地を新しいものに交換した。その結果、BMSC または BMSC-Nkx2.5-GATA4 を単独で培養したときと比較して、約 10 倍拍動する心筋の数が増加した。この結果、Nkx2.5 と GATA4 遺伝子の強制発現と心筋細胞との共培養を組み合わせることで、心筋分化効率は 500 倍以上上昇することが明らかになった。

#### 実施例 10. KUM2 細胞と BMSC 細胞の表面抗原の解析

KUM2 細胞と BMSC 細胞の異同を明らかにすること、骨髓中から効率的に心筋形成能を有する単離・精製するために、KUM2 細胞と BMSC 細胞の表面抗原の解析を行った。

解析に用いたのは、血管内皮細胞の表面抗原として知られている CD105、Flk-1、CD31、CD144、造血系細胞の表面抗原として知られている CD34、CD117(c-kit)、CD14、CD45、CD90、Ly6A/E(Sca-1)、Ly6c、Ly6g、間葉系細胞の表面抗原として知られている CD140、インテグリン CD49b、CD49d、CD29 マトリックス受容体 CD54、CD102、CD106、CD44 の 20 種類である。

まず KUM2 細胞および BMSC 細胞の各  $1 \times 10^4$  個を 96 ウェル U 字プレートにそれぞれ分注した。公知の方法 [酵素抗体法: 学際企画刊 (1985)] でビオチン標識した抗マウス CD105 抗体 (Pharmingen 社製) を FACS 用緩衝液 (1% BSA-PBS、0.02% EDTA、0.05% NaN<sub>3</sub>、pH 7.4) に加え各ウェルに添加し、氷中で 30 分間反応させた。コントロール抗体としては、ラット IgG2a、κ 精製抗体 (Pharmingen 社製) を用いた。緩衝液で 2 回洗浄後、 streptavidin-PE (日本ベクトン・ディッキンソン社製) を  $20 \mu\text{l}$  加えた。遮光し氷中で 30 分間反応後、緩衝液で 3 回洗浄し、最終的に  $500 \mu\text{l}$  に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、抗体の添加により蛍光強度が増加するか否かで抗体の発現の有無を調べた。その結果を第 1 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに CD105 陰性であった。

Flk-1 抗原の発現についても、上記と同様の方法によりビオチン化した抗マウス Flk-1 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28181D) を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第 2 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに Flk-1 陰性細胞であった。

CD31 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD31 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01954D) を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第 3 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに CD31 陰性であった。

CD144 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28091D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第4図に示す。KUM2 細胞は CD144 隣性細胞であったが、BMSC 細胞は CD144 弱陽性細胞であった。

CD34 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD34 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09434D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第5図に示す。KUM2 細胞は CD34 隣性細胞であったが、BMSC 細胞は CD34 陽性細胞と陰性細胞の混合物であった。

CD117 (c-kit) 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD117 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01904D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第6図に示す。KUM2 細胞は CD117 隣性細胞であったが、BMSC 細胞は CD117 陽性細胞であった。

CD14 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD14 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09474) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第7図に示す。KUM2 細胞は CD14 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD14 隣性細胞であった。

CD45 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01114) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第8図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD45 隣性細胞であった。

CD90 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第9図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD90 隣性細胞であった。

Ly6A/E(Sca-1) 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1) 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01164A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第10図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6A/E(Sca-1) 陽性細胞であった。

Ly6c 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01152) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第11

図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6c 陽性細胞であった。

Ly6g 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第12 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6g 陰性細胞であった。

CD140 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28011A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第13 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD140 陽性細胞であった。

CD49b 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09794) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第14 図に示す。KUM2 細胞は CD49b 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD49b 陰性細胞であった。

CD49d 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01274) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第15 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD49d 陰性細胞であった。

CD29 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22634) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第16 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD29 陽性細胞であった。

CD54 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01544) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第17 図に示す。KUM2 細胞は CD54 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD54 陰性であった。

CD102 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01804) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第18 図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD102 陰性細胞であった。

CD106 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01814) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第19 図に示す。KUM2 細胞は CD106 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD106 陰性細胞であった。

CD44 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体 (Pharmingen 社製;

PM-28154)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第20図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD44 陽性細胞であった。

表1にフローサイトメーターで測定した解析結果をまとめた。

表1

	KUM2	BMSC
<b>Hemato</b>		
CD34	-	± *1
CD117(c-kit)	-	+
CD14	+	-
CD45	-	-
CD90(Thy1)	-	-
Ly-6a/e(Sca1)	+	+
Ly6c	+	+
Ly6g	-	-
<b>Endothelial</b>		
Flk-1	-	-
CD31	-	-
CD105	-	-
CD144	-	+ *2
<b>Mesenchymal</b>		
CD140 (PDGFR)	+	+
<b>Integrin</b>		
CD49b(α 2)	+	-
CD49d(α 4)	-	-
CD29(β 1)	+	+
<b>Matrix</b>		
CD54(ICAM-1)	+	-
CD102(ICAM-2)	-	-
CD106(VCAM-1)	+	-
CD44(Hyaluronate)	+	+

\*1:混合物 \*2:弱陽性

#### 実施例11. マウス MLC2v プロモーターを利用した分化前駆細胞の濃縮

心筋細胞への分化を有するマウス骨髓由来細胞から心筋に分化する細胞を効率よく取得するため、心筋細胞に特異的に発現するマウス MLC2v (myosin light chain-2v) 遺伝子のプロモーター発現系を構築した。具体的には、マウス MLC2v 遺伝子のプロモーター配列下に EGFP 遺伝子(CLONTECH 社製)をつなぎ、neomycin 耐性遺伝子の発現ユニット含んだ pMLC-2-EGFP プラスミドを構築した。このプラスミドの DNA を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等に記

載のアルカリ中和法により取得した。

上記 DNA  $2 \mu \text{g}$  を、予め6穴プレートに  $1 \times 10^5$  個となるように培養しておいた KUM2 細胞に対し、リポフェクトアミン (LIFE TECHNOLOGY 社製) を用いて遺伝子導入をおこなった。具体的な方法は製品の添付プロトコルに従った。遺伝子導入して 48 時間後に G418 (Sigma 社製) を終濃度  $1\text{mg/ml}$  となるよう添加し、生存している遺伝子導入細胞だけを選択した。

遺伝子を導入して 14 日目の細胞に対し、5-aza-C を終濃度  $3 \mu \text{M}$  となるように添加し、24 時間後に培地を交換して、分化誘導をおこなった。分化誘導後、3 日目より GFP 陽性細胞が観察された。分化誘導後 4 日目の細胞うち、 $1 \times 10^4$  個の細胞を FACS Caliber (Becton Dickinson 社製) で GFP 陽性細胞のみを分取し更に培養を続けた。その結果、9 割以上の細胞が筋管様構造を有する細胞に分化しており、効率的に分化する細胞を濃縮できたといえる。この GFP 陽性細胞は FACS で分取後、実施例 10 の方法に従い、移植を行うと血管内皮への分化は認められず、骨格筋や心筋などの筋肉系組織への分化が特異的に観察された。

#### 実施例12. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞からの脂肪細胞の誘導

心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) は心筋細胞以外に脂肪細胞に分化誘導することができる。この脂肪細胞への分化を制御する目的で分化誘導条件の検討を行った。まず、PPAR- $\gamma$  受容体の発現を定量的 PCR 法により解析を行った結果、BMSC 細胞は PPAR- $\gamma$  1受容体は発現しているが、PPAR  $\gamma$  2受容体は発現していないことが観察された。次に、PPAR- $\gamma$  受容体のアゴニストである Pioglitazone、Troglitazone を、様々な濃度で心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) に添加したところ、濃度依存的に脂肪細胞分化が促進され、 $0.4 \mu \text{M}$  で約 50%、 $2 \mu \text{M}$  ではほぼ 100% の細胞が脂肪細胞へと分化した。

#### 実施例13. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞を胚盤胞への移植による神経系細胞、肝細胞、心筋細胞への分化誘導

はじめに、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) を GFP で標識した安定形質転換細胞を得るため、以下の方法で遺伝子導入をおこなった。

まず、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社) に GFP を組み込み、

pCLNC-GFP を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-GFP と Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター(Imgenex 社)を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晩 37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター-DNA 5 μ g を 250mM CaCl<sub>2</sub> (pH 6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター(Millipore 社製)でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞(BMSC)は、ウィルスをインフェクションさせる前日に 2×10<sup>4</sup> 細胞/ウェルとなるように 6 ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウィルスベクターを含む溶液に、終濃度 8 μ g/ml となるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma 社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞(BMSC)の培地と置換し、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5 時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2 日間培養を行った後、G418 を終濃度 300 μ g/ml になるように添加し、さらに 7 日間培養した。この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして取得した、GFP 標識された心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を、6cm の培養ディッシュで増殖させ、培地を除去後、0.5ml の 0.25% のトリプシン EDTA を添加して1分間処理した後、1.5ml の新しい培地を添加して、細胞を懸濁したところに、ウシ胎児血清(Lexicon Genetics 社製)を加えて混合し、該細胞懸濁液をマウス胚盤胞への注入に用いた。マウス胚盤胞は過排卵処理を施した雌の C57Bl/6J マウスを同系の雄マウスと自然交配させ、4 日後に摘出した子宮の内部を M15 培地で灌流することにより取得した。これらを 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で胚盤胞腔が十分に膨らむまで放置した後、約 4°C に冷却した 20mM の HEPES を含む M15 培地中に移し、マイクロインジェクター(成茂科学社製)及びマイクロマニピュレーター(成茂科学社製)を装備した倒立顕微鏡(ニコン社製)下で観察しながら、注入針を操作し 10~15 個の BMSC 細胞を胚盤胞腔内へ顕微注入した。該胚盤胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で胚盤胞腔が膨らむまで放置した後、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)に記載の方法に従い、偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスの卵管側子宮部分に移植後、着床させた。

偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスは、10 週以降の精管結さつ雄 MCH 系統マウスと移植 3 日前の 17:00 に 1:1 で同居、交配させ、翌朝 9:00 に膣栓確認を行い、2 日後に上記の目的で使用した。

誕生したマウスを解剖して、臓器を摘出し、GFP の発現を観察した。その結果、脳内ならびに肝臓で GFP の発現が観察され BMSC が神経系ならびに肝臓に分化することが示された。また、別の個体から取得した心臓より、ゲノム DNA を取得し、配列番号 79、80 のプライマーを用いて PCR を行った結果、BMSC が心臓にも取り込まれることが確認された。これらの結果は、BMSC が、神経、心臓、肝臓の 3 胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示した。

#### 実施例14. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞でのテロメラーゼ活性

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞のテロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol(TRAP)法により検討した(Oncor 社製 TRAPeze Telomerase Detection Kit)。テロメラーゼ活性の測定は原則的に添付されていたプロトコールに従ったが、具体的には以下の通りに行った。まず、6cm 径の培養皿上で培養した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞(およそ 10<sup>6</sup> 個)を PBS で洗浄した後、200 μl の 1 × CHAPS

液を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、溶液と共に細胞を 1.5ml 容遠沈管に回収し、14,000rpm で 20 分間遠心分離(4°C、HITACHI 社製 himacCF15)し、上清を細胞抽出液として回収した。Protein assay (BioRad 社製)を用いて蛋白質含有量を測定したところ、上記条件で取得した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の細胞抽出液はおよそ 1mg/ml であった。

次にこの細胞抽出液を用いて、プロトコールに従ってテロメア伸長反応及び PCR 増幅を行った。Taq ポリメラーゼは EX Taq polymerase (宝酒造製)を用いた。反応終了後の試料は 10×染色液 (0.25%bromophenol blue, 0.25%Xylene cyanol FF, 30% glycerol) を 1/10 量添加し、12.5%ポリアクリルアミドゲル (TRAPeze Telomerase Detection Kit のプロトコールに記載されている通り調製) に載せ、250mV 定電圧下で泳動した。泳動後、ゲルをサイバーグリーン (FMC 社製) で染色し、蛍光色素分析装置、Fluorolmager(Molecular Dynamics 社製)を用いて解析した。その結果、細胞抽出液の終濃度が 0.4~4 μ g/ml の試料でテロメラーゼ活性が検出された。

#### 実施例15. ラット骨髓からの心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の取得と培養

5週齢の Wistar rat(日本 SLC 株式会社)雌6匹を頸椎脱臼した後、70%エタノールを充分かけ消毒した。次に足部の皮膚を広範囲に渡り切開し、大腿骨や脛骨を覆う筋肉を切除しながら、大腿骨と脛骨を取り出した。取り出した大腿骨と脛骨は PBS (GibcoBRL 社製)の入った 10cm 径培養皿(岩城硝子社製)に移し、筋肉及び関節を完全に切除した。続いてこれらの骨の両端をハサミで切り、20G 注射針を付けた 10ml 用注射器(テルモ社製)を用いて、培養液 (D-PBS、GibcoBRL 社製)の水流で骨髓中の内容物を押し出した。取得した細胞塊はさらに注射器を通して一様になるようほぐした。このようにして得た細胞浮遊液は 50ml 容遠沈管 (BECTON DICKINSON 社製) に回収し、1,500rpm で 10 分間遠心分離し (TOMY 社製低速遠心機)、沈殿した細胞を 6ml の D-PBS 中に懸濁した。改良ノイバウエル型血球計算盤にて細胞数を計測したところ、回収した細胞は合計  $2.6 \times 10^9$  個であった。大腿骨または脛骨 1 本当たりから  $1 \times 10^8$  個の細胞を回収したことになる。回収した細胞は 1ml 当たり  $1.3 \times 10^8$  個の濃度になるよう希釈し、50ml 容遠沈管に入った 1.073g/ml に調製された Percoll(Amersham Pharmacia Biotech 社製)/D-PBS 液 (25ml) 上に 5ml 重層した後、室温で 3,100rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、Percoll 液と細胞浮遊液との界面

より細胞を回収し、D-PBS で 4 倍に希釈した後、2300rpm で 10 分間遠心分離し、分画した細胞集団を回収した。回収した細胞は 20%FCS、100  $\mu$  g/ml penicillin, 250 ng/ml streptomycin, 85  $\mu$  g/ml amphotericin (GibcoBRL 社製) を含む IMDM 培地 (GibcoBRL 社製) に懸濁した。この時点で再度細胞数を計測したところ、回収した骨髓由来細胞は合計  $4.7 \times 10^7$  個あり、処理前の細胞の約 2%相当を回収したことになる。このようにして分画した骨髓由来細胞は  $2 \sim 5 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> になるように 10cm 径の動物細胞用の培養皿 (岩城硝子社製、以下 10cm 培養皿と略す) 3枚に撒き、CO<sub>2</sub> 培養器 (タバイ社製) にて 33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度で培養を開始した。培地は 24 時間後、72 時間後にそれぞれ半分交換した。その 3 ~ 4 日後に培地を半分交換した。15 日経過し、コロニーが密集してきたので、細胞をトリプシン EDTA 処理ではがし、2/3 は 4ml の保存液 (10%DMSO、50%の骨髓由来細胞培養上清、40%の未使用上記培地) に懸濁し、2ml 容チューブ (住友ベークライト社製) に 1 本当たり 1ml 分注して凍結保存し、残り 1/3 は 10cm 培養皿 2 枚に蒔き直し継代した。

#### 実施例16. ラット骨髓由来細胞の心筋細胞への分化能の検討

上記で継代したラット骨髓由来細胞は密集したところを再度トリプシン EDTA 処理ではがし、6 ウェルプレート (BECTON DICKINSON 社製) には 1 ウェル当たり  $5 \times 10^4$  個になるよう、またヒトフィブロネクチンをコートした 6cm 径の培養皿 (BECTON DICKINSON 社製 Biocoat) には  $1.3 \times 10^5$  個になるように細胞を蒔き直した。1 日後に 5-アザシチジン (Sigma 社製、終濃度 10  $\mu$  M) のみを加えたものと、5-アザシチジン、PDGF-BB (Pepro Tech EC LTD. 社製、終濃度 10ng/ml)、all-trans レチノイン酸 (RA、Sigma 社製、終濃度 10<sup>-9</sup>M) を加えた二種類の異なる培養条件培養を行い、2 日間培養した後に培地を交換した (後者の場合は培地交換時に再度 PDGF、all-trans レチノイン酸を加え、2 日後と 4 日後にさらに加えた)。その 3 ~ 4 日後に、培地を交換し、3 週間培養した。その結果 5-アザシチジン、PDGF-BB、レチノイン酸を加えたもので筋管様細胞の分化が観察された。

#### 実施例17. 転写因子 MesP1 の強制発現およびサイトカイン添加による心筋細胞分化の促進

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 (BMSC) に、心筋細胞分化に関する転写因子 MesP1 を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響、および MesP1 の強制発現とサイトカイン (FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4) の添加とを組み合わせることによる

心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

実施例6で示した方法と同様の方法で、レトロウィルスベクターを用いて、MesP1 遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1)を取得し、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

MesP1 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1) を  $2 \times 10^4$  細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μM となるように添加した後、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml となるように添加 (培養ディッシュN)、ET-1 を終濃度 10ng/ml となるように添加 (培養ディッシュP)、Midkine を終濃度 10ng/ml となるように添加 (培養ディッシュQ)、BMP4 を終濃度 10ng/ml となるように添加 (培養ディッシュR)、添加なし (培養ディッシュS) の 5 種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュNには FGF-8 を終濃度 10ng/ml となるように添加し、培養ディッシュPには ET-1 を終濃度 10ng/ml となるように添加、培養ディッシュQには Midkine を終濃度 10ng/ml となるように添加、培養ディッシュRには BMP4 を終濃度 10ng/ml となるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから 4 週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、MesP1 の強制発現によって筋管様細胞の数は大きく変化しなかった。また、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となつた。

次に、得られた筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71～78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、MesP1 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である ANP の発現が亢進された。一方、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 は MesP1 の強制発現により促進される ANP の発現をさらに亢進することはなかった。

### 産業上の利用可能性

本発明によれば、心筋細胞の破壊ならびに変性を伴う心疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な骨髄細胞、増殖因子、ビタミン、接着分子、及びこれらの利用法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号33－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号34－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号35－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号36－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号37－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号38－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号39－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号40－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号41－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号42－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号43－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号44－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号45－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号46－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号47－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号48－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号49－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号50－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号51－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号52－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号53－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号54－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号55－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号56－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号57－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号58－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号59－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号60－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号61－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号62－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号63－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号64－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号65－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号66－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号67－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号68－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号69－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号70－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号71－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号72－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号73－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号74－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号75－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号76－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号77－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号78－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号79－人工配列の説明:合成 DNA  
配列番号80－人工配列の説明:合成 DNA

### 請求の範囲

1. 生体組織または臍帯血から単離され、少なくとも心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
2. 生体組織が骨髓である、請求項1記載の細胞。
3. 細胞が、多分化能幹細胞であることを特徴とする、請求項1または2記載の細胞。
4. 細胞が、少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞。
5. 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の細胞。
6. 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞。
7. 細胞が、成体組織のいかなる細胞にも分化する能力を有する全能性幹細胞であることを特徴とする、請求項1～3記載の細胞。
8. 細胞がCD 117陽性およびCD 140陽性である、請求項1～7のいずれか1項に記載の細胞。
9. 細胞が、さらにCD 34陽性である、請求項8記載の細胞。
10. 細胞が、さらにCD 144陽性である、請求項9記載の細胞。
11. 細胞が、さらにCD 144陰性である、請求項9記載の細胞。
12. 細胞が、CD 34陰性である、請求項8記載の細胞。
13. 細胞が、さらにCD 144陽性である、請求項12記載の細胞。
14. 細胞が、さらにCD 144陰性である、請求項12記載の細胞。
15. 細胞が、さらにCD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性およびCD 44陽性である、請求項10記載の細胞。
16. 細胞が、さらにCD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD

106陰性およびCD 44陽性である、請求項11記載の細胞。

17. 細胞が、さらにCD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性およびCD 44陽性である、請求項12記載の細胞。

18. 細胞が、さらにCD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性およびCD 44陽性である、請求項13記載の細胞。

19. Hoechst 33342を取り込まない、請求項1記載の細胞。

20. 請求項1～19のいずれか1項に記載の細胞から誘導される心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞。

21. 心室筋細胞に分化する能力を有する、請求項1～20のいずれか1項に記載の細胞。

22. 洞結節細胞に分化する能力を有する、請求項1～20のいずれか1項に記載の細胞。

23. 生体組織または臍帯血がほ乳動物由来のものである、請求項1～22のいずれか1項に記載の細胞。

24. ほ乳動物がマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サルおよびヒトから選ばれる1種である、請求項23記載の細胞。

25. 細胞が、マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細胞。

26. 染色体DNAの脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、請求項1～25のいずれか1項に記載の細胞。

27. 染色体DNAの脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチシンおよびジメチルスルフォキシド(DMSO)からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、請求項26記載の細胞。

28. デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、請求項27記載の細胞。

29. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心

筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

30. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項29記載の細胞。

31. サイトカインが血小板由来増殖因子(PDGF)、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

32. PDGF が配列番号3または5で表されるアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64で表されるアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項31記載の細胞。

33. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

34. ビタミンがレチノイン酸である、請求項30記載の細胞。

35. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

36. Nkx2.5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項35記載の細胞。

37. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項30記載の細胞。

38. 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) により心筋細胞への分化が抑制される請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

39. FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、請求項3～8記載の細胞。

40. 心臓に移植することにより心筋細胞または血管に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

41. 胚盤胞に移植すること、または心筋細胞と共に培養を行うことにより、心筋に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

42. 核内受容体 PPAR- $\gamma$ を活性化因子により脂肪細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

43. 核内受容体 PPAR- $\gamma$ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする請求項42記載の細胞。

44. チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項43記載の細胞。

45. 胚盤胞に移植すること、または脳または脊髄に移植することにより、神経系細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

46. 胚盤胞に移植すること、または肝臓に移植することにより、肝細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

47. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

48. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、請求項9記載の細胞から請求項12記載の細胞へ脱分化させる方法。

49. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、CD 117陰性および CD 140陽性の細胞から請求項8記載の細胞へ脱分化させる方法。

50. 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびDMSOからなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項48および49記載の方法。

51. デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請

求項50記載の方法。

52. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

53. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項52記載の方法。

54. サイトカインがPDGF、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

55. PDGF が配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64のアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項54記載の方法。

56. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

57. ビタミンがレチノイン酸である、請求項53記載の方法。

58. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

59. Nkx2.5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求

項58記載の方法。

60. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項53記載の方法。

61. 核内受容体 PPAR- $\gamma$ を活性化する因子を用いることを特徴とする、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から脂肪細胞を分化させる方法。

62. 核内受容体 PPAR- $\gamma$ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする請求項61記載の方法。

63. チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項62記載の方法。

64. 染色体DNAの脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

65. 染色体DNAの脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチシンおよびDMSOからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項64記載的心筋形成剤。

66. デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請求項65記載的心筋形成剤。

67. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

68. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項67記載的心筋形成剤。

69. サイトカインがPDGF、纖維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)、骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載的心筋形成剤。

70. PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項69記載的心筋形成剤。

71. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載の心筋形成剤。

72. ビタミンがレチノイン酸である、請求項71記載の心筋形成剤。

73. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載の心筋形成剤。

74. Nkx2.5/Csx が配列番号9記載のアミノ酸配列で表される、GATA4 が配列番号11記載のアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13記載のアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15記載のアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17記載のアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19記載のアミノ酸配列、dHAND が配列番号21記載のアミノ酸配列、eHAND が配列番号23記載のアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25記載のアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27記載のアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29記載のアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62記載のアミノ酸配列でそれぞれ表される、請求項73記載の心筋形成剤。

75. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項68記載の心筋形成剤。

76. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

77. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生薬。

78. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

79. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

80. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

81. 請求項80記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、請求項1～48のいずれか1項に記載の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法。

82. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に

特異的な表面抗原を取得する方法。

83. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

84. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

85. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

86. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

87. テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項86記載の方法。

88. テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

89. テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項88記載の治療薬。

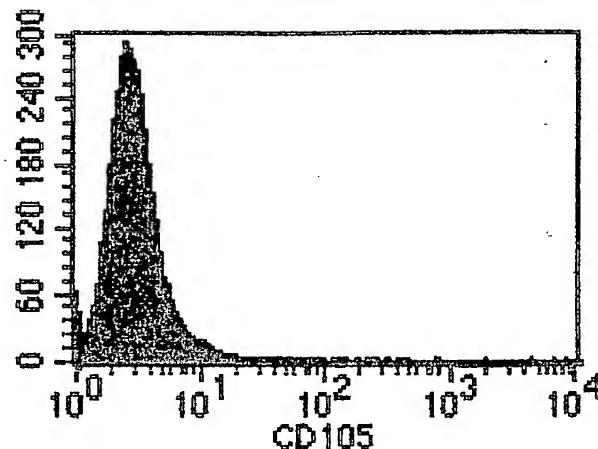
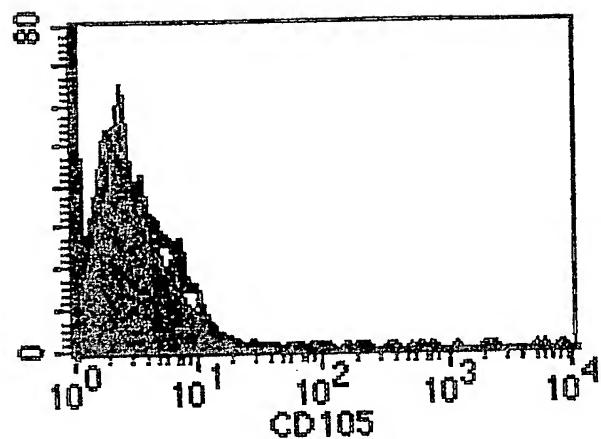
90. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

91. 請求項90記載の培養上清を用いることを特徴とする、請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

第1図

A

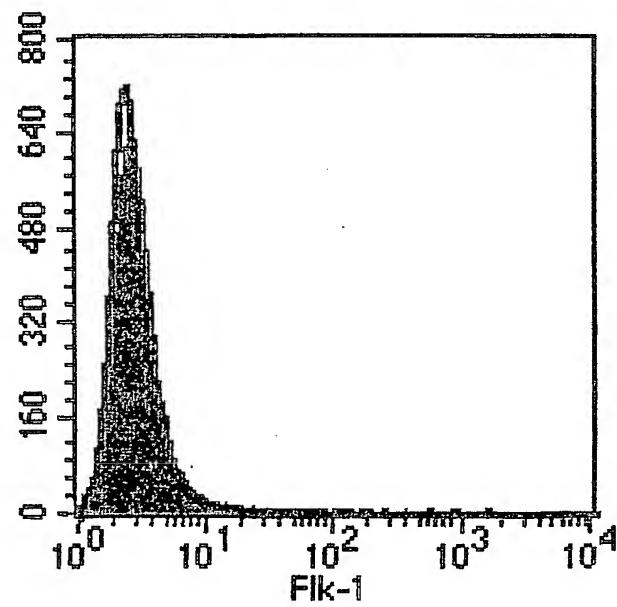
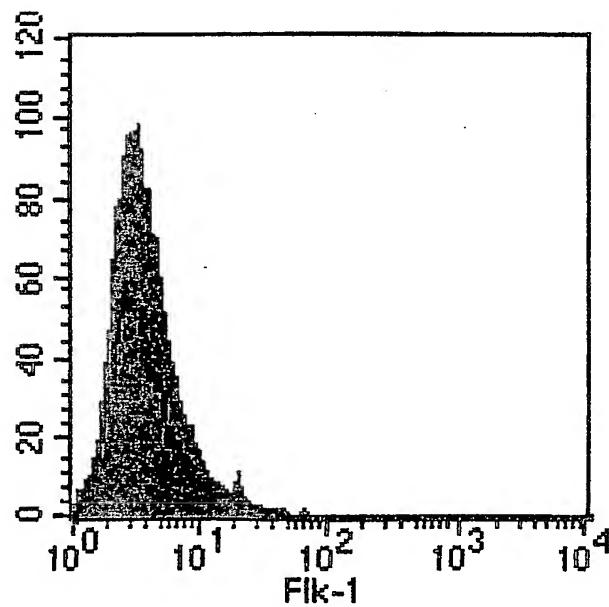
B



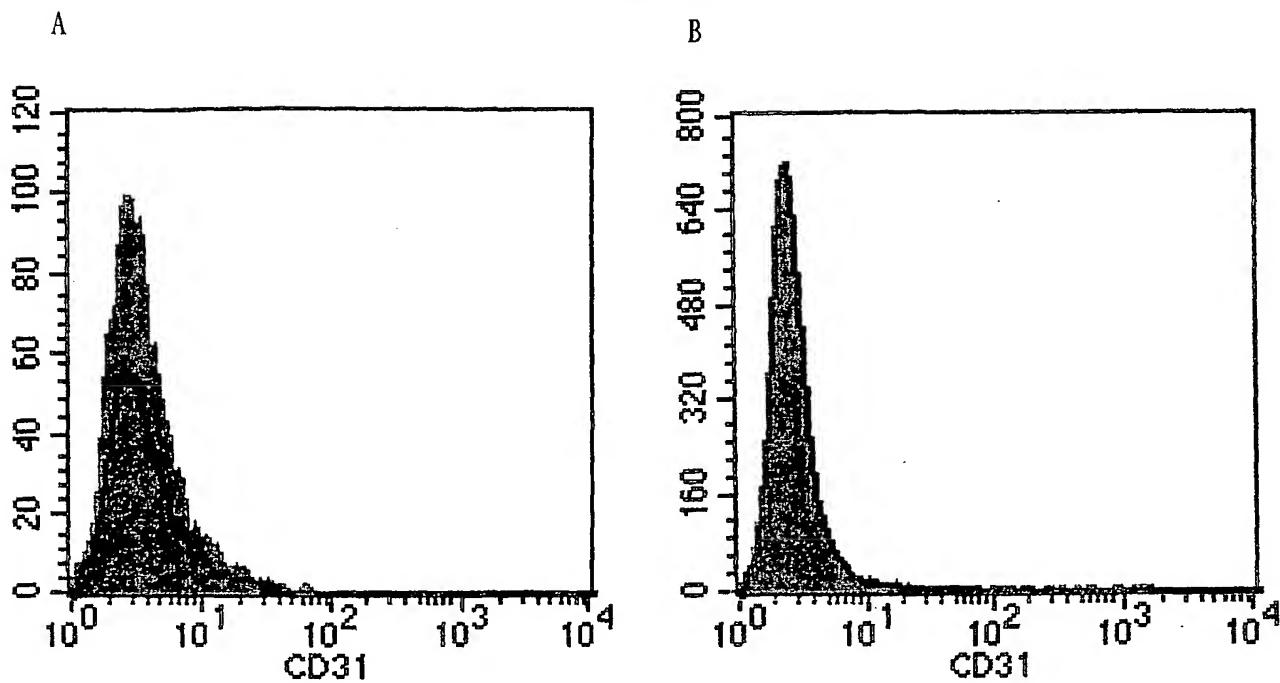
第2図

A

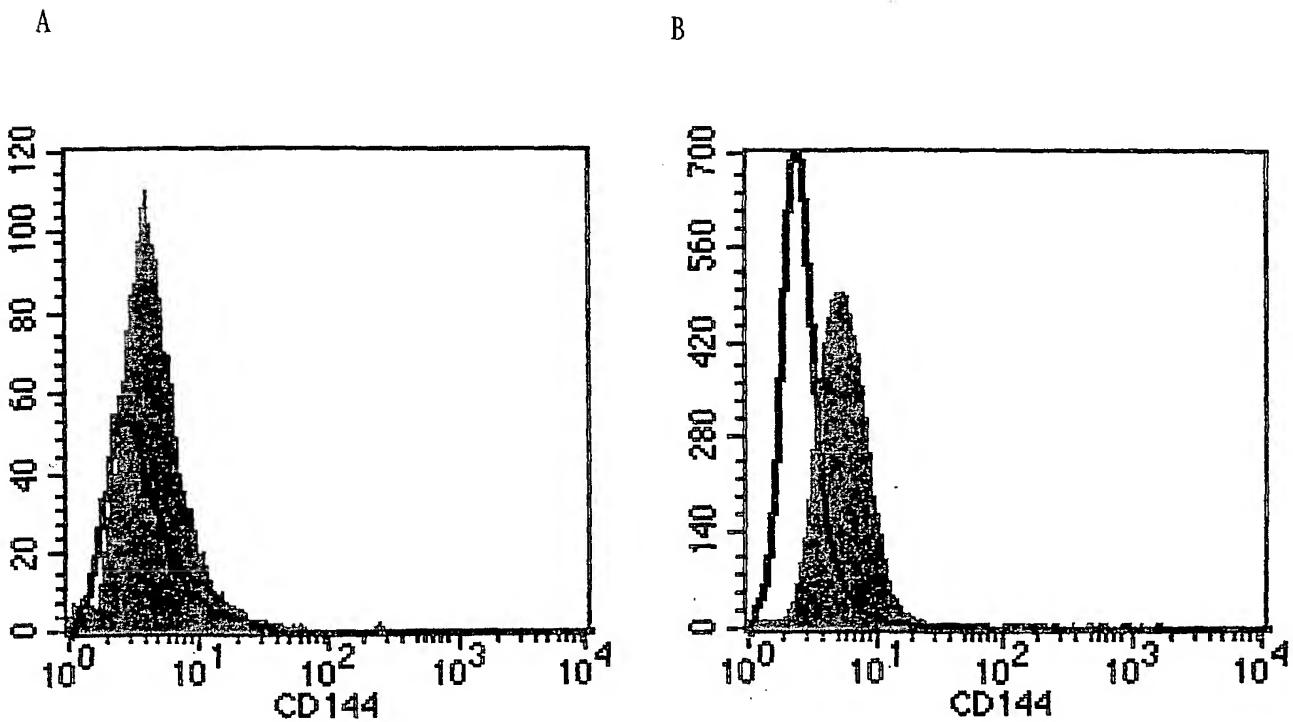
B



第3図

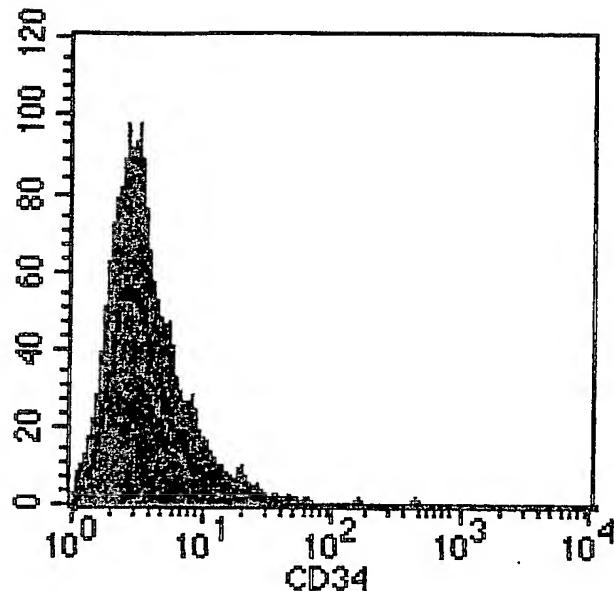


第4図

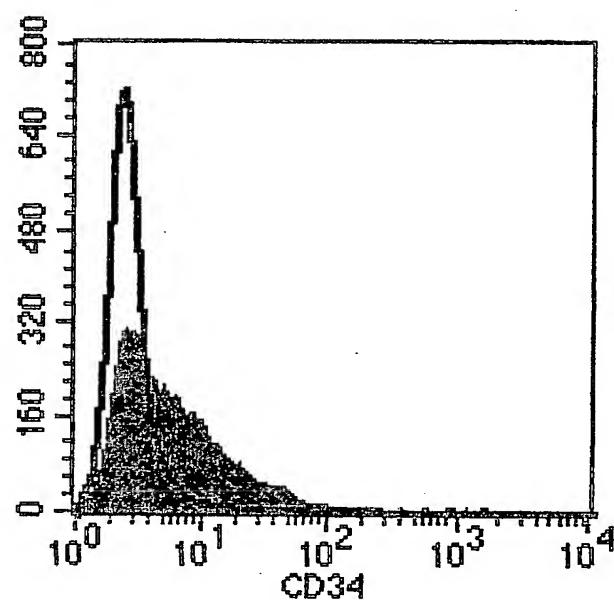


## 第5図

A

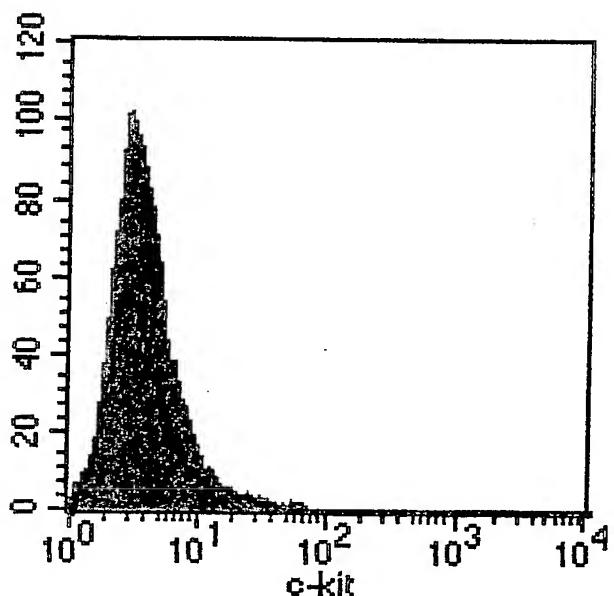


B

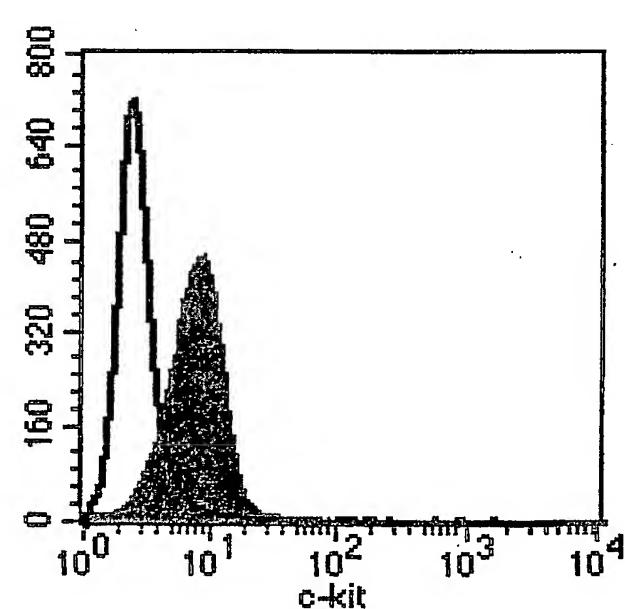


第6回

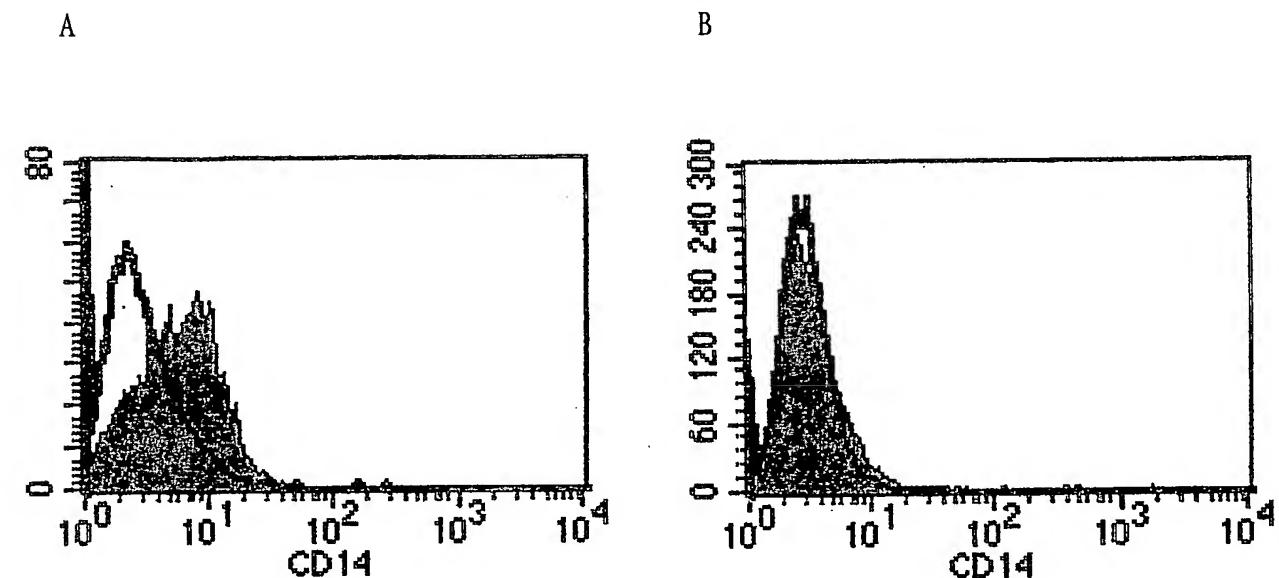
A



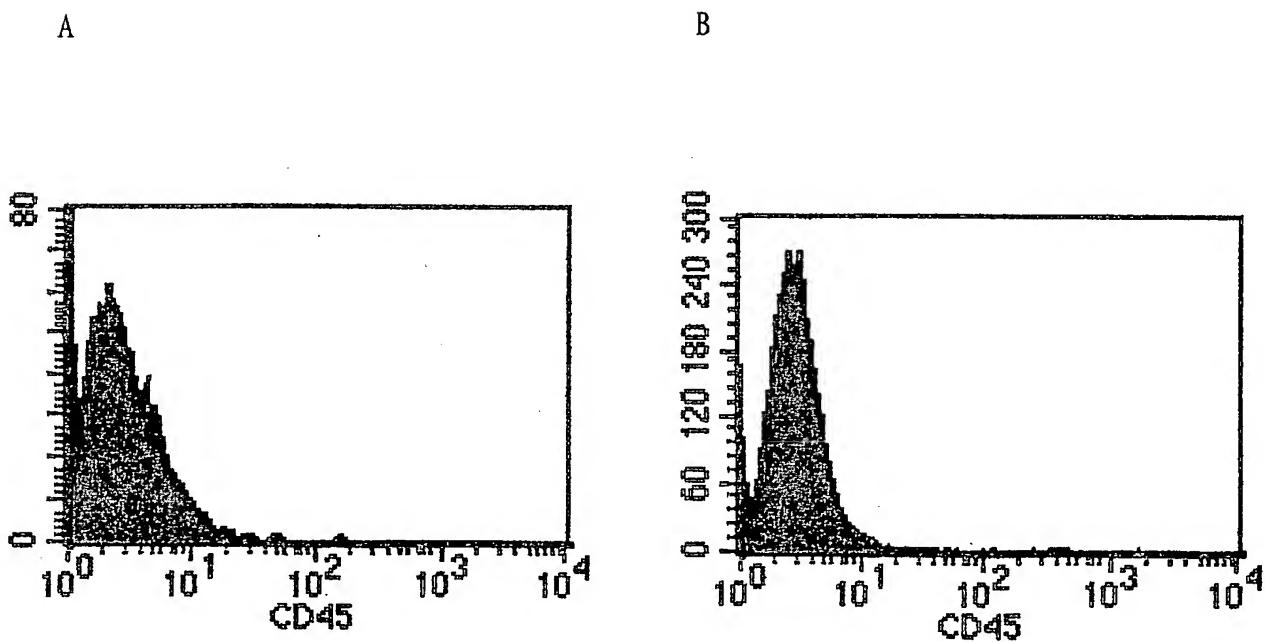
B



第7図



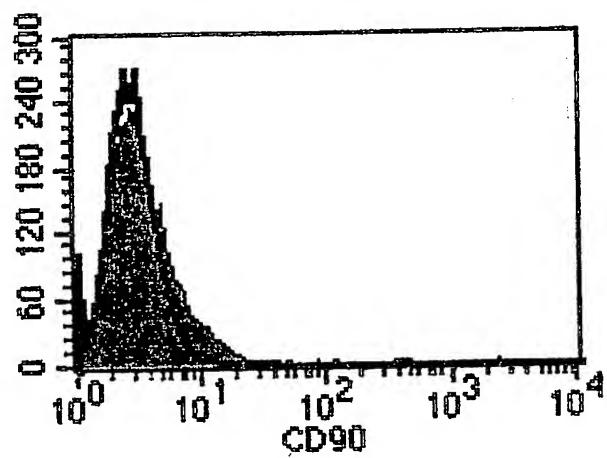
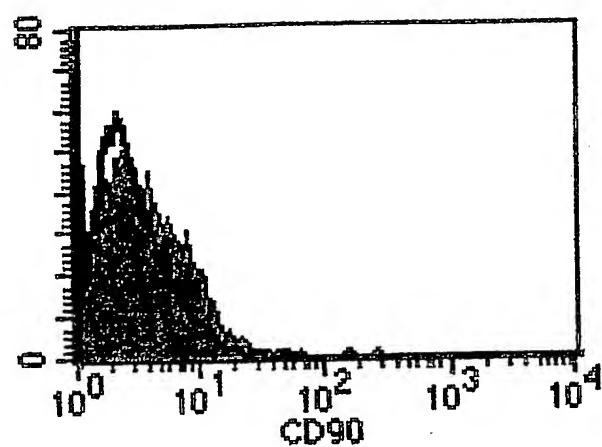
第8図



第 9 図

A

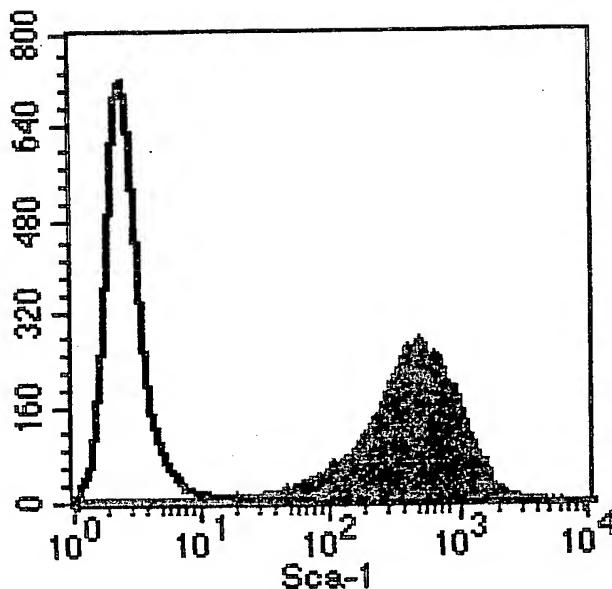
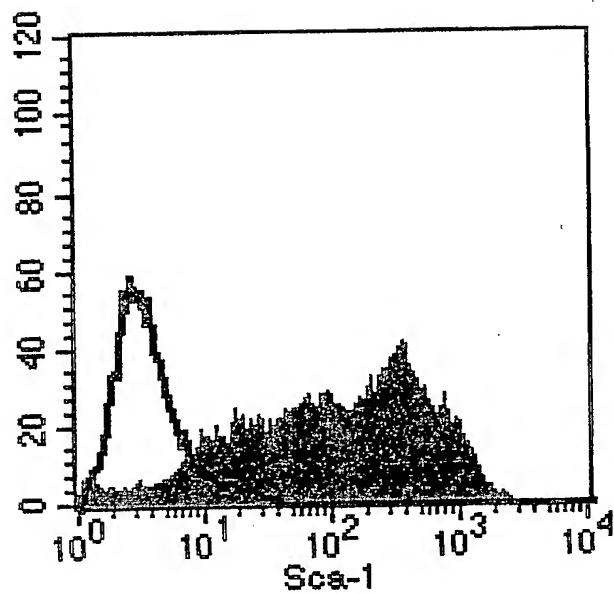
B



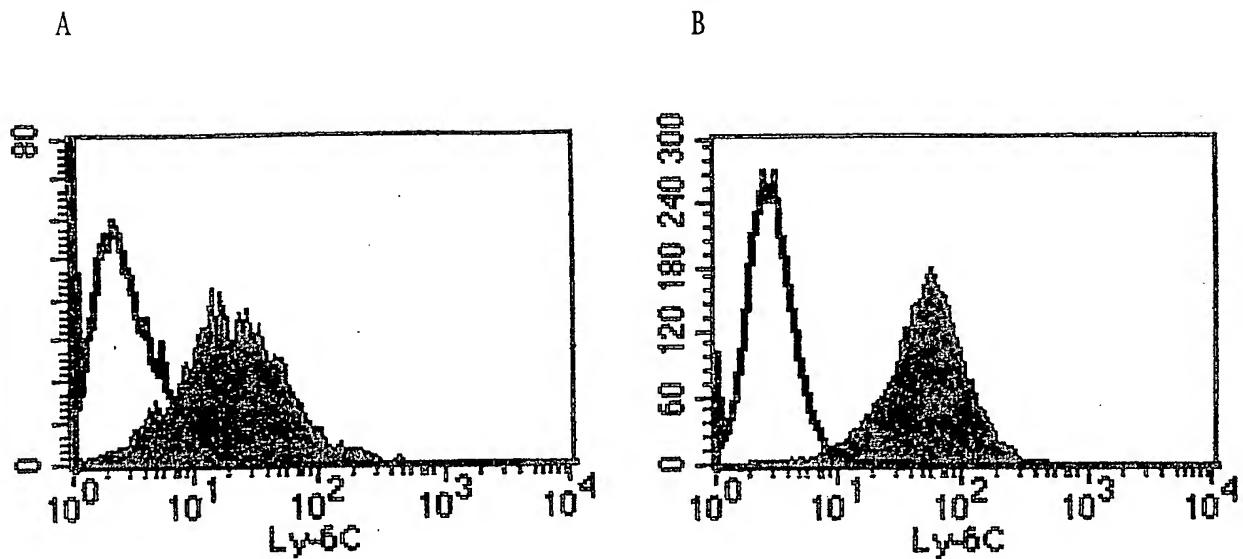
第 10 図

A

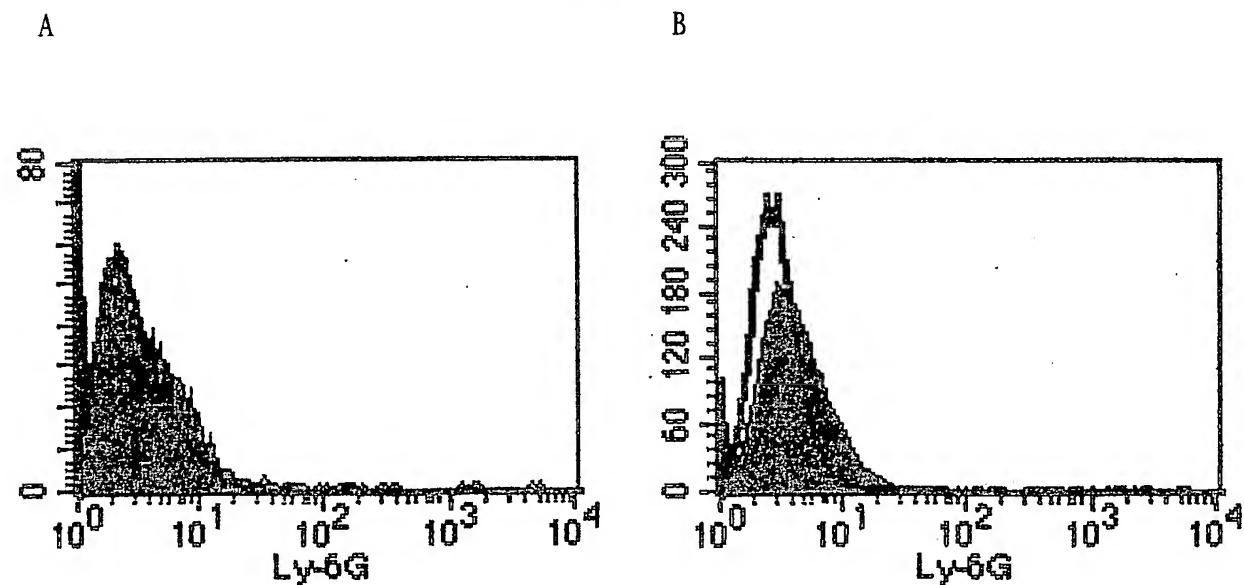
B



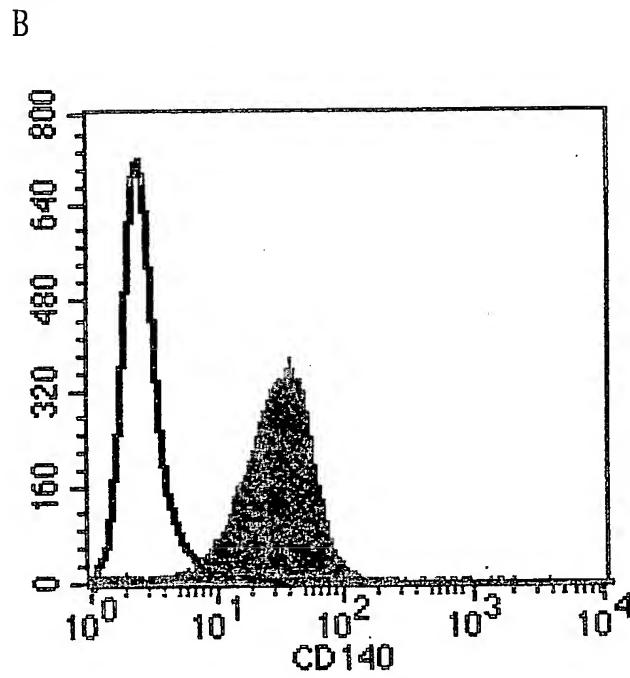
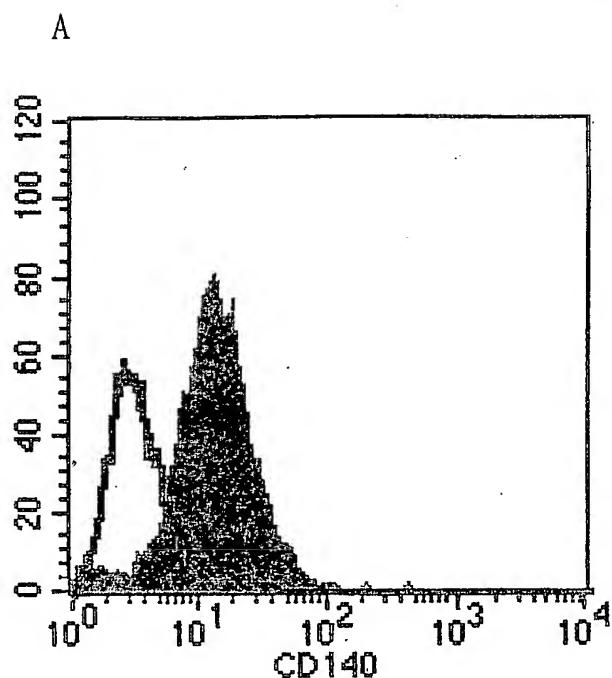
第11回



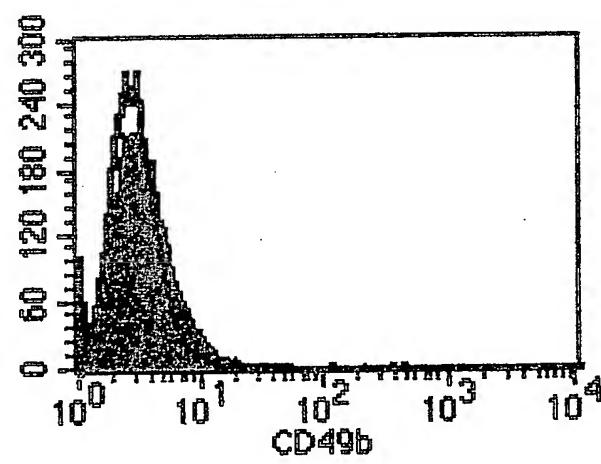
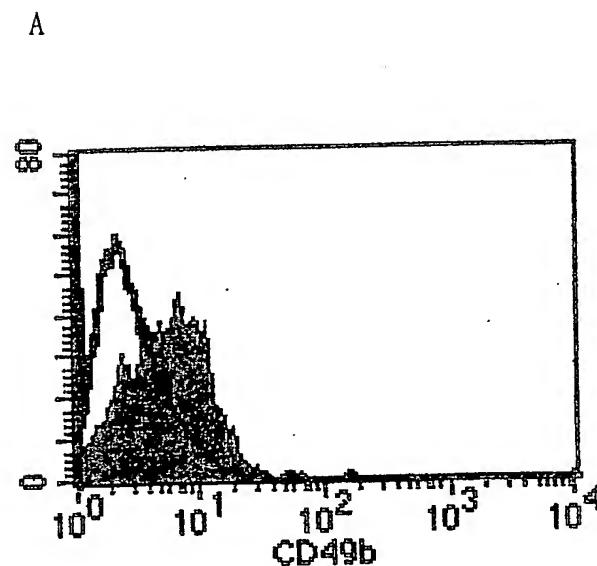
第12回



第13図



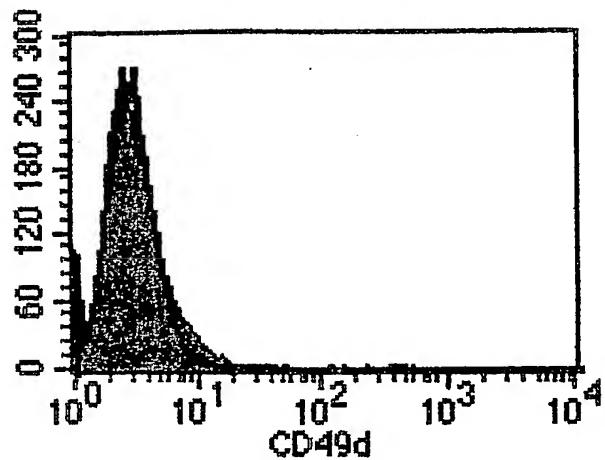
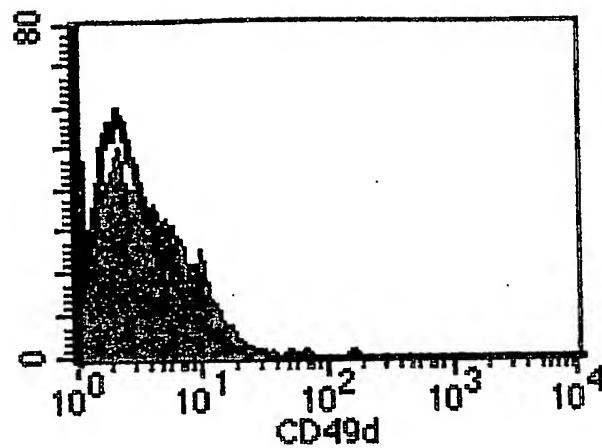
第14図



第15図

A

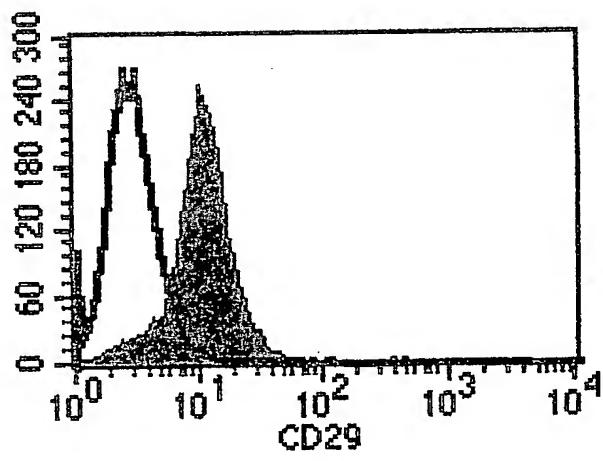
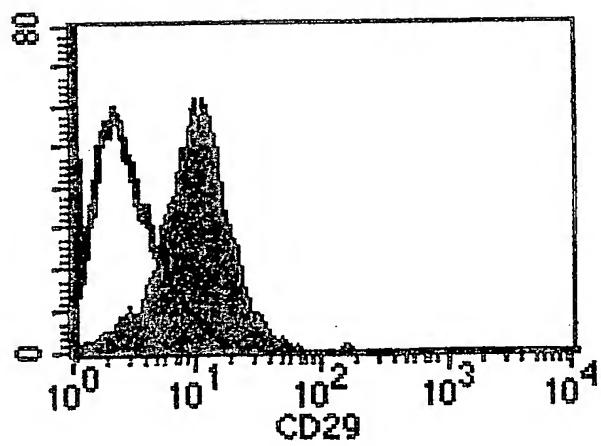
B



第16図

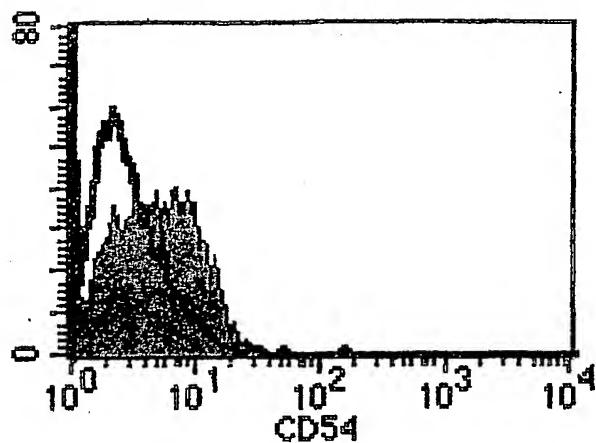
A

B

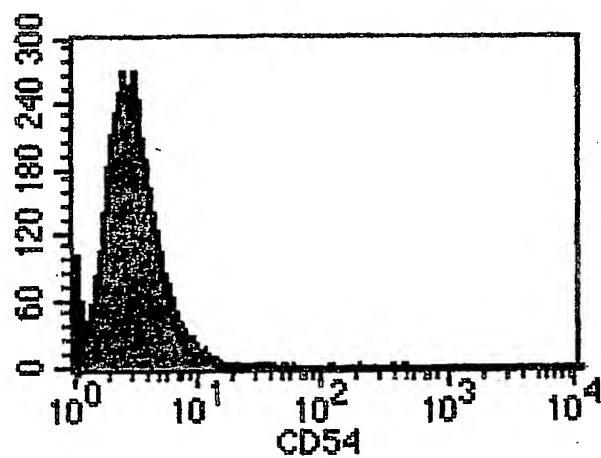


第17図

A

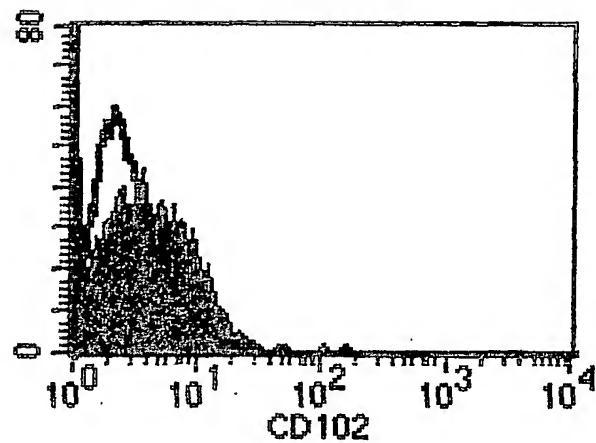


B

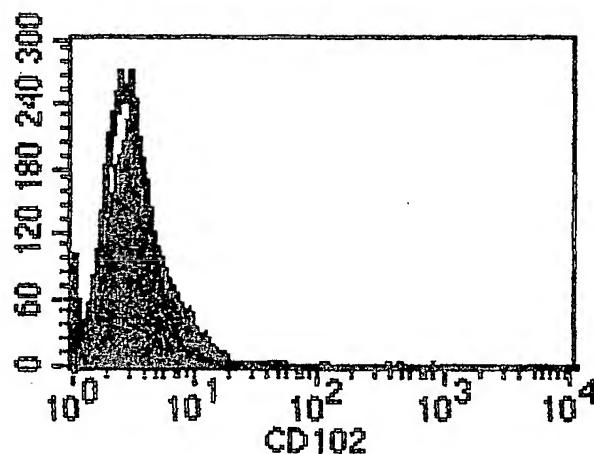


第18図

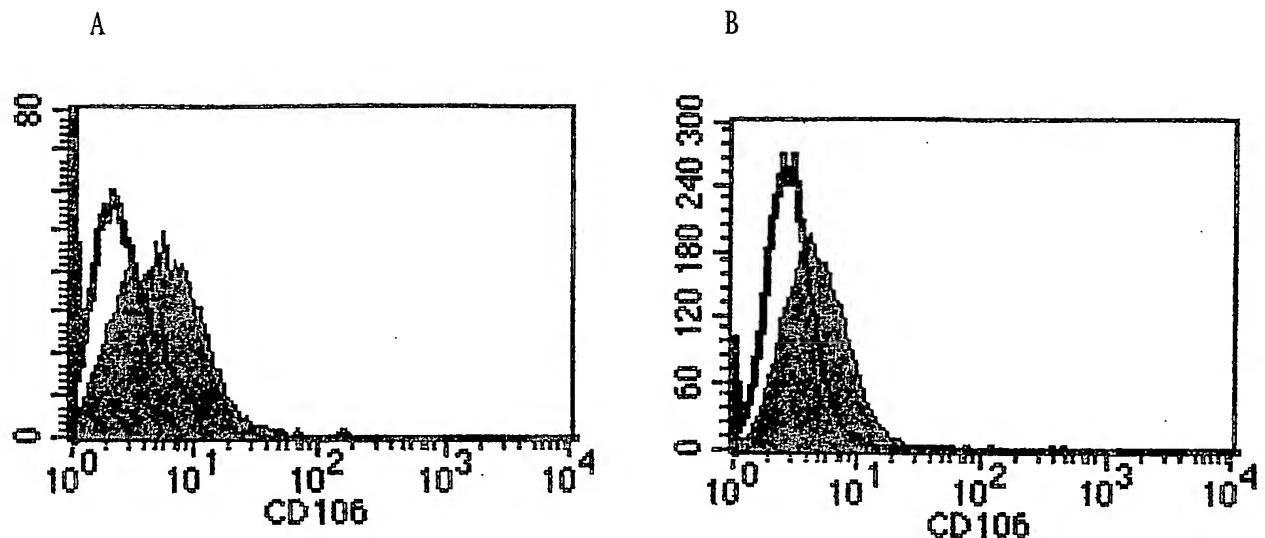
A



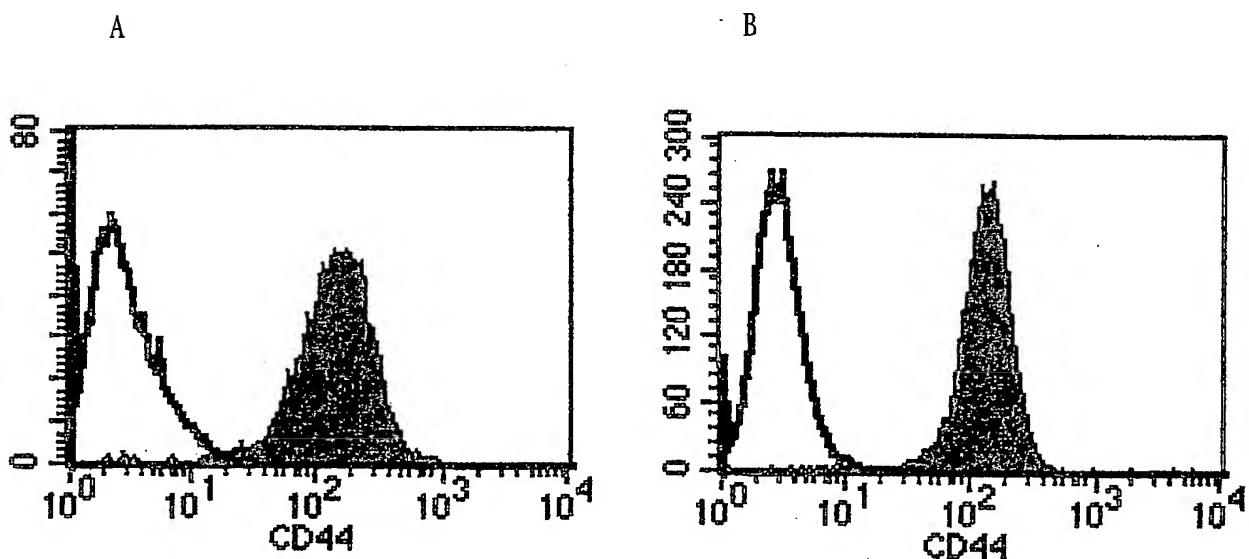
B



第19図



第20図



## 配 列 表

## SEQUENCING LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

&lt;111&gt; THE CELL HAVING THE POTENTIALITY OF DIFFERENTIATION INTO CARDIOMYOCYTES

&lt;130&gt; 11217W03

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; H11-372826

&lt;151&gt; 1999-12-28

&lt;150&gt; PCT-JP00-01148

&lt;151&gt; 2000-02-28

&lt;150&gt; PCT-JP00-07741

&lt;151&gt; 2000-11-02

&lt;160&gt;80

&lt;170&gt; PatentIn Ver.2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Arg Ala His Pro Gly Gly Gly Arg Cys Cys Pro Glu Gln Glu Glu  
1 5 10 15  
Gly Glu Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Asp Ser Ala Ile  
20 25 30  
Glu Gln Gly Gly Gln Gly Ser Ala Leu Ala Pro Ser Pro Val Ser Gly  
35 40 45

Val	Arg	Arg	Glu	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Trp	
50					55				60						
Lys	Gln	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Cys	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	
65					70				75				80		
Gly	Arg	Gly													
					85				90				95		
Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Cys	Gly	
					100				105				110		
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Pro	Val	Pro
					115				120				125		
Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Arg	Ala	Thr
					130				135				140		
Glu	Ser	Gly	Lys	Arg	Met	Asp	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Trp	Lys
					145				150				155		160
Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Arg	Lys	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Asp
					165				170				175		
Val	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Phe	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln
					180				185				190		
Leu	Ala	Arg	Tyr	Leu	Gly	Asn	Thr	Val	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe
					195				200				205		
Arg	Thr	Gly	Lys	Met	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Lys	Gln	Arg
					210				215				220		
Leu	Arg	Asn	Asp	Pro	Leu	Asn	Gln	Asn	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Leu	Asn
					225				230				235		240
Thr	Thr	Leu	Pro	Ile	Arg	Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Val
					245				250				255		
Thr	Lys	Val	Thr	Asn	His	Pro	Ser	Asn	Lys	Val	Lys	Ser	Asp	Pro	Gln
					260				265				270		
Arg	Met	Asn	Glu	Gln	Pro	Arg	Gln	Leu	Phe	Trp	Glu	Lys	Arg	Leu	Gln
					275				280				285		
Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Gln	Ile	Ile	Lys	Thr	Met	Glu
					290				295				300		
Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Glu	Thr
					305				310				315		320
Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	His	Thr	Ser	Ser	Ala	Pro	Ile
					325				330				335		

Thr Gly Gln Val Ser Ala Ala Val Glu Lys Asn Pro Ala Val Trp Leu  
           340                     345                 350  
 Asn Thr Ser Gln Pro Leu Cys Lys Ala Phe Ile Val Thr Asp Glu Asp  
           355                     360                 365  
 Ile Arg Lys Gln Glu Glu Arg Val Gln Gln Val Arg Lys Lys Leu Glu  
           370                     375                 380  
 Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ala Ala Asp Thr Glu Glu  
           385                     390                 395                 400  
 Met Asp Ile Glu Met Asp Ser Gly Asp Glu Ala  
           405                     410

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1233

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(1236)

&lt;400&gt; 2

atg cgc gcg cac ccg ggg gga ggc cgc tgc tgc ccg gag cag gag gag	48
Met Arg Ala His Pro Gly Gly Arg Cys Cys Pro Glu Gln Glu Glu	
1                      5                     10                 15	
ggg gag agt gcg gcg ggc agc ggc gct ggc gac tcc gcc ata	96
Gly Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gly Ala Gly Gly Asp Ser Ala Ile	
20                     25                     30	
gag cag ggg ggc cag ggc agc gcg ctc gcc ccg tcc ccg gtg agc ggc	144
Glu Gln Gly Gln Gly Ser Ala Leu Ala Pro Ser Pro Val Ser Gly	
35                     40                     45	
gtg cgc agg gaa ggc gct cgg ggc ggc cgt ggc cgg ggg cgg tgg	192
Val Arg Arg Glu Gly Ala Arg Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Trp	
50                     55                     60	
aag cag gcg ggc cgg ggc ggc gtc tgt ggc cgt ggc cgg ggc cgg	240
Lys Gln Ala Gly Arg Gly Gly Val Cys Gly Arg Gly Arg Gly Arg	
65                     70                     75                 80	
ggc cgt ggc cgg gga cgg gga cgg ggc cgg cgg ggc cgc ggc cgt	288
Gly Arg	
85                     90                     95	

ccc ccg agt ggc ggc agc ggc ctt ggc ggc gac ggc ggc tgc ggc		336	
Pro Pro Ser Gly Gly Ser Gly Leu Gly Gly Asp Gly Gly Cys Gly			
100	105	110	
ggc ggc ggc agc ggt ggc ggc ggc gcc ccc cgg cgg gag ccg gtc cct		384	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro Arg Arg Glu Pro Val Pro			
115	120	125	
ttc ccg tcg ggg agc gcg ggg ccc agg gga ccc cgg gcc acg		432	
Phe Pro Ser Gly Ser Ala Gly Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg Ala Thr			
130	135	140	
gag agc ggg aag agg atg gat tgc ccg gcc ctc ccc ccc gga tgg aag		480	
Glu Ser Gly Lys Arg Met Asp Cys Pro Ala Leu Pro Pro Gly Trp Lys			
145	150	155	160
aag gag gaa gtg atc cga aaa tct ggg cta agt gct ggc aag agc gat		528	
Lys Glu Glu Val Ile Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ala Gly Lys Ser Asp			
165	170	175	
gtc tac tac ttc agt cca agt ggt aag aag ttc aga agc aag cct cag		576	
Val Tyr Tyr Phe Ser Pro Ser Gly Lys Lys Phe Arg Ser Lys Pro Gln			
180	185	190	
ttg gca agg tac ctg gga aat act gtt gat ctc agc agt ttt gac ttc		624	
Leu Ala Arg Tyr Leu Gly Asn Thr Val Asp Leu Ser Ser Phe Asp Phe			
195	200	205	
aga act gga aag atg atg cct agt aaa tta cag aag aac aaa cag aga		672	
Arg Thr Gly Lys Met Met Pro Ser Lys Leu Gln Lys Asn Lys Gln Arg			
210	215	220	
ctg cga aac gat cct ctc aat caa aat aag ggt aaa cca gac ttg aat		720	
Leu Arg Asn Asp Pro Leu Asn Gln Asn Lys Gly Lys Pro Asp Leu Asn			
225	230	235	240
aca aca ttg cca att aga caa aca gca tca att ttc aaa caa ccg gta		768	
Thr Thr Leu Pro Ile Arg Gln Thr Ala Ser Ile Phe Lys Gln Pro Val			
245	250	255	
acc aaa gtc aca aat cat cct agt aat aaa gtg aaa tca gac cca caa		816	
Thr Lys Val Thr Asn His Pro Ser Asn Lys Val Lys Ser Asp Pro Gln			
260	265	270	
cga atg aat gaa cag cca cgt cag ctt ttc tgg gag aag agg cta caa		864	
Arg Met Asn Glu Gln Pro Arg Gln Leu Phe Trp Glu Lys Arg Leu Gln			
275	280	285	

gga ctt agt gca tca gat gta aca gaa caa att ata aaa acc atg gaa		912	
Gly Leu Ser Ala Ser Asp Val Thr Glu Gln Ile Ile Lys Thr Met Glu			
290	295	300	
cta ccc aaa ggt cttcaa gga gtt ggt cca ggt agc aat gat gag acc		960	
Leu Pro Lys Gly Leu Gln Gly Val Gly Pro Gly Ser Asn Asp Glu Thr			
305	310	315	320
ctt tta tct gct gtt gcc agt gct ttg cac aca agc tct gcg cca atc		1008	
Leu Leu Ser Ala Val Ala Ser Ala Leu His Thr Ser Ser Ala Pro Ile			
325	330	335	
aca ggg caa gtc tcc gct gct gtg gaa aag aac cct gct gtt tgg ctt		1056	
Thr Gly Gln Val Ser Ala Ala Val Glu Lys Asn Pro Ala Val Trp Leu			
340	345	350	
aac aca tct caa ccc ctc tgc aaa gct ttt att gtc aca gat gaa gac		1104	
Asn Thr Ser Gln Pro Leu Cys Lys Ala Phe Ile Val Thr Asp Glu Asp			
355	360	365	
atc agg aaa cag gaa gag cga gta cag caa gta cgc aag aaa ttg gaa		1152	
Ile Arg Lys Gln Glu Glu Arg Val Gln Gln Val Arg Lys Lys Leu Glu			
370	375	380	
gaa gca ctg atg gca gac atc ttg tcg cga gct gct gat aca gaa gag		1200	
Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ala Ala Asp Thr Glu Glu			
385	390	395	400
atg gat att gaa atg gac agt gga gat gaa gcc		1233	
Met Asp Ile Glu Met Asp Ser Gly Asp Glu Ala			
405	410		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala			
1	5	10	15
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg			
20	25	30	
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu			
35	40	45	
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg			

50	55	60
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu		
65	70	75
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys		80
85	90	95
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro		
100	105	110
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg		
115	120	125
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg		
130	135	140
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys		
145	150	155
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu		160
165	170	175
Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp		
180	185	190
Thr Asp Val Arg		
195		

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(591)

&lt;400&gt; 4

atg agg acc ttg gct tgc ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc	48		
Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala			
1	5	10	15

cat gtt ctg gcc gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg	96		
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg			
20	25	30	

ctg gcc cgc agt cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg	144		
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu			
35	40	45	

gag ata gac tcc gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga	192
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg	
50 55 60	
gct cac ggg gtc cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg	240
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu	
65 70 75 80	
ccc att cgg agg aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc	288
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys	
85 90 95	
aag acc agg acg gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc	336
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro	
100 105 110	
acg tcc gcc aac ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc	384
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg	
115 120 125	
tgc acc ggc tgc tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc	432
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg	
130 135 140	
gtc cac cac cgc agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag	480
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys	
145 150 155 160	
aag cca aaa tta aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag	528
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu	
165 170 175	
tgc gcc tgc gcg acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac	576
Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp	
180 185 190	
acg gat gtg agg	588
Thr Asp Val Arg	
195	
<210> 5	
<211> 241	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg	

1	5	10	15												
Leu	Val	Ser	Ala	Glu	Gly	Asp	Pro	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Met
				20					25						30
Leu	Ser	Asp	His	Ser	Ile	Arg	Ser	Phe	Asp	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu
				35					40						45
His	Gly	Asp	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Asn	Met
				50					55						60
Thr	Arg	Ser	His	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg
	65				70					75					80
Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Pro	Ala	Met	Ile	Ala	Glu
				85					90						95
Cys	Lys	Thr	Arg	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Ile	Ser	Arg	Arg	Leu	Ile	Asp
				100					105						110
Arg	Thr	Asn	Ala	Asn	Phe	Leu	Val	Trp	Pro	Pro	Cys	Val	Glu	Val	Gln
				115					120						125
Arg	Cys	Ser	Gly	Cys	Cys	Asn	Asn	Arg	Asn	Val	Gln	Cys	Arg	Pro	Thr
				130				135							140
Gln	Val	Gln	Leu	Arg	Pro	Val	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Glu	Ile	Val	Arg
	145				150				155						160
Lys	Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Leu
				165					170						175
Ala	Cys	Lys	Cys	Glu	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Val	Thr	Arg	Ser
				180					185						190
Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Glu	Gln	Arg	Ala	Lys	Thr	Pro	Gln	Thr	Arg	Val
				195					200						205
Thr	Ile	Arg	Thr	Val	Arg	Val	Arg	Arg	Pro	Pro	Lys	Gly	Lys	His	Arg
	210				215						220				
Lys	Phe	Lys	His	Thr	His	Asp	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Gly
	225				230					235					240
Ala															
<210>	6														
<211>	723														
<212>	DNA														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<221>	CDS														

&lt;223&gt; (1)..(726)

&lt;400&gt; 6

atg aat cgc tgc tgg gcg ctc ttc ctg tct ctc tgc tac ctg cgt	48
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg	
1 5 10 15	
ctg gtc agc gcc gag ggg gac ccc att ccc gag gag ctt tat gag atg	96
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met	
20 25 30	
ctg agt gac cac tcg atc cgc tcc ttt gat gat ctc caa cgc ctg ctg	144
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
35 40 45	
cac gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc gag ttg gac ctg aac atg	192
His Gly Asp Pro Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met	
50 55 60	
acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag agc ttg gct cgt gga aga	240
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg	
65 70 75 80	
agg agc ctg ggt tcc ctg acc att gct gag ccg gcc atg atc gcc gag	288
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu	
85 90 95	
tgc aag acg cgc acc gag gtg ttc gag atc tcc cgg cgc ctc ata gac	336
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp	
100 105 110	
cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg ccc tgt gtg gag gtg cag	384
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln	
115 120 125	
cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac gtg cag tgc cgc ccc acc	432
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr	
130 135 140	
cag gtg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga aag atc gag att gtg cgg	480
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg	
145 150 155 160	
aag aag cca atc ttt aag aag gcc acg gtg acg ctg gaa gac cac ctg	528
Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu	
165 170 175	
gca tgc aag tgt gag aca gtg gca gct gca cgg cct gtg acc cga agc	576

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser  
           180                     185                     190  
 ccg ggg ggt tcc cag gag cag cga gcc aaa acg ccc caa act cgg gtg   624  
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val  
           195                     200                     205  
 acc att cgg acg gtg cga gtc cgc cgg ccc ccc aag ggc aag cac cgg   672  
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg  
           210                     215                     220  
 aaa ttc aag cac acg cat gac aag acg gca ctg aag gag acc ctt gga   720  
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly  
  225                     230                     235                     240  
 gcc  723  
 Ala  
 <210> 7  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly  
   1                     5                             10                     15  
 Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu  
           20                     25                     30  
 Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg  
           35                     40                     45  
 Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu  
           50                     55                     60  
 Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn  
   65                     70                             75                     80  
 Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys  
           85                     90                     95  
 Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr  
           100                     105                     110  
 Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys  
           115                     120                     125  
 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys  
           130                     135                     140

Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser  
 145                            150  
 <210> 8  
 <211> 465  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <223> (1)..(468)  
 <400> 8

atg	gca	gcc	ggg	agc	atc	acc	acg	ctg	ccc	gcc	ttg	ccc	gag	gat	ggc	48
Met	Ala	Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	
1	5	10												15		
ggc	agc	ggc	gcc	ttc	ccg	ccc	ggc	cac	ttc	aag	gac	ccc	aag	cgg	ctg	96
Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	
20	25													30		
tac	tgc	aaa	aac	ggg	ggc	ttc	ttc	ctg	cgc	atc	cac	ccc	gac	ggc	cga	144
Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	
35		40												45		
gtt	gac	ggg	gtc	cgg	gag	aag	agc	gac	cct	cac	atc	aag	cta	caa	ctt	192
Val	Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	
50		55												60		
caa	gca	gaa	gag	aga	gga	gtt	gtg	tct	atc	aaa	gga	gtg	tgt	gct	aac	240
Gln	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	
65		70												80		
cgt	tac	ctg	gct	atg	aag	gaa	gat	gga	aga	tta	ctg	gct	tct	aaa	tgt	288
Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	
85		90												95		
gtt	acg	gat	gag	tgt	ttc	ttt	ttt	gaa	cga	ttg	gaa	tct	aat	aac	tac	336
Val	Thr	Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr		
100		105												110		
aat	act	tac	egg	tca	agg	aaa	tac	acc	agt	tgg	tat	gtg	gca	ttg	aaa	384
Asn	Thr	Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys	
115		120												125		
cga	act	ggg	cag	tat	aaa	ctt	gga	tcc	aaa	aca	gga	cct	ggg	cag	aaa	432
Arg	Thr	Gly	Gln	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln	Lys	

130	135	140	
gct ata ctt ttt ctt cca atg tct gct aag agc			465
Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser			
145	150	155	
<210> 9			
<211> 324			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 9			
Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp			
1	5	10	15
Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu			
20	25	30	
Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu			
35	40	45	
Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro			
50	55	60	
Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala			
65	70	75	80
Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala			
85	90	95	
Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Lys Glu			
100	105	110	
Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp			
115	120	125	
Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu			
130	135	140	
Phe Ser Gln Ala Gln Val Tyr Glu Leu Glu Arg Arg Arg Phe Lys Gln Gln			
145	150	155	160
Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys			
165	170	175	
Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys			
180	185	190	
Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro			
195	200	205	
Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val			

210	215	220
Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala		
225	230	235
Tyr Gly Val Gly Leu Asn Pro Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr		
245	250	255
Pro Gly Tyr Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala		
260	265	270
Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala		
275	280	285
Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln		
290	295	300
Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly		
305	310	315
Ile Arg Ala Trp		

<210>	10			
<211>	972			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<221>	CDS			
<223>	(1)..(975)			
<400>	10			
atg ttc ccc agc cct gct ctc acg ccc acg ccc ttc tca gtc aaa gac				48
Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp				
1	5	10	15	
atc cta aac ctg gaa cag cag cag cgc agc ctg gct gcc gcc gga gag				96
Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Glu				
20	25	30		
ctc tct gcc cgc ctg gag gcg acc ctg gcg ccc tcc tcc tgc atg ctg				144
Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu				
35	40	45		
gcc gcc ttc aag cca gag gcc tac gct ggg ccc gag gcg gct gcg ccg				192
Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro				
50	55	60		
ggc ctc cca gag ctg cgc gca gag ctg ggc cgc gcg cct tca ccg gcc				240

Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala			
65	70	75	80
aag tgt gcg tct gcc ttt ccc gcc ccc gcc ttc tat cca cgt gcc			288
Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala			
85	90	95	
tac agc gac ccc gac cca gcc aag gac cct aga gcc gaa aag aaa gag			336
Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Glu			
100	105	110	
ctg tgc gcg ctg cag aag gcg gtg gag ctg gag aag aca gag gcg gac			384
Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp			
115	120	125	
aac gcg gag cgg ccc cgg gcg cga cgg cgg agg aag ceg cgc gtg ctc			432
Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu			
130	135	140	
ttc tcg cag gcg cag gtc tat gag ctg gag cgg cgc ttc aag cag cag			480
Phe Ser Gln Ala Gln Val Tyr Glu Leu Glu Arg Arg Phe Lys Gln Gln			
145	150	155	160
cgg tac ctg tcg gcc ccc gaa cgc gac cag ctg gcc agc gtg ctg aaa			528
Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys			
165	170	175	
ctc acg tcc acg cag gtc aag atc tgg ttc cag aac cgg cgc tac aag			576
Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys			
180	185	190	
tgc aag cgg cag cgg cag gac cag act ctg gag ctg gtg ggg ctg ccc			624
Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro			
195	200	205	
ccg ccg ccg ccg cct gcc cgc agg atc gcg gtg cca gtg ctg gtg			672
Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val			
210	215	220	
cgc gat ggc aag cca tgc cta ggg gac tgc gcg ccc tac gcg cct gcc			720
Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala			
225	230	235	240
tac ggc gtg ggc ctc aat ccc tac ggt tat aac gcc tac ccc gcc tat			768
Tyr Gly Val Gly Leu Asn Pro Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr			
245	250	255	
ccg ggt tac ggc ggc gcg gcc tgc agc cct ggc tac agc tgc act gcc			816

Pro Gly Tyr Gly Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala  
                  260                 265                 270  
 gct tac ccc gcc ggg cct tcc cca gcg cag ccg gcc act gcc gcc gcc   864  
 Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala  
                  275                 280                 285  
 aac aac aac ttc gtg aac ttc ggc gtc ggg gac ttg aat gcg gtt cag   912  
 Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln  
                  290                 295                 300  
 agc ccc ggg att ccg cag agc aac tcg gga gtg tcc acg ctg cat ggt   960  
 Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly  
                  305                 310                 315                 320  
 atc cga gcc tgg   972  
 Ile Arg Ala Trp  
                  324  
 <210> 11  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly  
       1              5                 10                 15  
 Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala  
       20                 25                 30  
 Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val  
       35                 40                 45  
 Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly  
       50                 55                 60  
 Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro  
       65                 70                 75                 80  
 Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly  
       85                 90                 95  
 Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly  
       100                105                 110  
 Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu  
       115                120                 125  
 Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala

130	135	140
Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser		
145	150	155
Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala		160
165	170	175
Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu		
180	185	190
Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe		
195	200	205
Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser		
210	215	220
Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr Leu Cys Asn Ala		
225	230	235
Cys Gly Leu Tyr His Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg Pro Leu Ile Lys		240
245	250	255
Pro Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly Leu Ser Cys Ala		
260	265	270
Asn Cys Gln Thr Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg Asn Ala Glu Gly		
275	280	285
Glu Pro Val Cys Asn Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys Leu His Gly Val		
290	295	300
Pro Arg Pro Leu Ala Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Arg		
305	310	315
Lys Pro Lys Asn Leu Asn Lys Ser Lys Thr Pro Ala Ala Pro Ser Gly		320
325	330	335
Ser Glu Ser Leu Pro Pro Ala Ser Gly Ala Ser Ser Asn Ser Asn		
340	345	350
Ala Thr Thr Ser Ser Ser Glu Glu Met Arg Pro Ile Lys Thr Glu Pro		
355	360	365
Gly Leu Ser Ser His Tyr Gly His Ser Ser Ser Val Ser Gln Thr Phe		
370	375	380
Ser Val Ser Ala Met Ser Gly His Gly Pro Ser Ile His Pro Val Leu		
385	390	395
Ser Ala Leu Lys Leu Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Pro Val Ser Gln		400
405	410	415
Ser Pro Gln Thr Ser Ser Lys Gln Asp Ser Trp Asn Ser Leu Val Leu		

420	425	430	
Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala			
435	440		
<210> 12			
<211> 1326			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<223> (1)..(1329)			
<400> 12			
atg tat cag agc ttg gcc atg gcc gcc aac cac ggg ccg ccc ccc ggt      48			
Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly			
1	5	10	15
gcc tac cag gcg ggc ggc ccc ggc ccc ttc atg cac ggc gcg ggc gcc      96			
Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala			
20	25	30	
gcg tcc tcg cca gtc tac ctg ccc aca ccg cgg gtg ccc tcc tcc gtt      144			
Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val			
35	40	45	
ctg ggc ctg tcc tac ctc cag ggc gga ggc gcg ggc tct gcg tcc gga      192			
Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly			
50	55	60	
ggc ccc tcg ggc ggc agc ccc ggt ggg gcc gcg tct ggt gcg ggg ccc      240			
Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro			
65	70	75	80
ggg acc cag cag ggc agc ccg gga tgg agc cag gcg gga gcg acc gga      288			
Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly			
85	90	95	
gcc gct tac acc ccg ccg ccg gtg tcg ccg cgc ttc tcc ttc ccg ggg      336			
Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly			
100	105	110	
acc acc ggg tcc ctg gcg gcg gcg gct gcc gcc gcc ccg gaa      384			
Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu			
115	120	125	
gct gcg gcc tac agc agt ggc ggc gga gcg gcg ggt gcg ggc ctg gcg      432			

Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala			
130	135	140	
ggc cgc gag cag tac ggg cgc gcc ggc ttc gcg ggc tcc tac tcc agc			480
Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser			
145	150	155	160
ccc tac ccg gct tac atg gcc gac gtg ggc gcg tcc tgg gcc gca gcc			528
Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala			
165	170	175	
gcc gcc gcc tcc gcc ggc ccc ttc gac agc ccg gtc ctg cac agc ctg			576
Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu			
180	185	190	
ccc ggc cgg gcc aac ccg gcc gca cac ccc aat ctc gat atg ttt			624
Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe			
195	200	205	
gac gac ttc tca gaa ggc aga gag tgt gtc aac tgt ggg gct atg tcc			672
Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser			
210	215	220	
acc ccg ctc tgg agg cga gat ggg acg ggt cac tat ctg tgc aac gcc			720
Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr Leu Cys Asn Ala			
225	230	235	240
tgt ggc ctc tac cac aag atg aac ggc atc aac cgg ccg ctc atc aag			768
Cys Gly Leu Tyr His Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg Pro Leu Ile Lys			
245	250	255	
cct cag cgc cgg ctg tcc gcc tcc cgc cga gtg ggc ctc tcc tgt gcc			816
Pro Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly Leu Ser Cys Ala			
260	265	270	
aac tgc cag acc acc acc acc acg ctg tgg cgc cgc aat gcg gag ggc			864
Asn Cys Gln Thr Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg Asn Ala Glu Gly			
275	280	285	
gag cct gtg tgc aat gcc tgc ggc ctc tac atg aag ctc cac ggg gtg			912
Glu Pro Val Cys Asn Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys Leu His Gly Val			
290	295	300	
ccc agg cct ctt gca atg cgg aaa gag ggg atc caa acc aga aaa cgg			960
Pro Arg Pro Leu Ala Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Arg			
305	310	315	320
aag ccc aag aac ctg aat aaa tct aag aca cca gca gct cct tca ggc			1008

Lys	Pro	Lys	Asn	Leu	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly		
325								330						335			
agt	gag	agc	ctt	cct	ccc	gcc	agc	ggt	gct	tcc	agc	aac	tcc	agc	aac	1056	
Ser	Glu	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Asn		
340								345						350			
gcc	acc	acc	agc	agc	agc	gag	gag	atg	cgt	ccc	atc	aag	acg	gag	cct	1104	
Ala	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Met	Glu	Met	Arg	Pro	Ile	Lys	Thr	Glu	Pro
355								360						365			
ggc	ctg	tca	tct	cac	tac	ggg	cac	agc	agc	tcc	gtg	tcc	cag	acg	ttc	1152	
Gly	Leu	Ser	Ser	His	Tyr	Gly	His	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Phe		
370								375						380			
tca	gtc	agt	gct	atg	tct	ggc	cat	ggg	ccc	tcc	atc	cac	cct	gtc	ctc	1200	
Ser	Val	Ser	Ala	Met	Ser	Gly	His	Gly	His	Pro	Ser	Ile	His	Pro	Val	Leu	
385								390						395		400	
tcg	gcc	ctg	aag	ctc	tcc	cca	caa	ggc	tat	gct	tct	ccc	gtc	agc	cag	1248	
Ser	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Pro	Gln	Gly	Tyr	Ala	Ser	Pro	Val	Ser	Gln		
405								410						415			
tct	cca	cag	acc	agc	tcc	aag	cag	gac	tct	tgg	aac	agt	ctg	gtc	ttg	1296	
Ser	Pro	Gln	Thr	Ser	Ser	Lys	Gln	Asp	Ser	Trp	Asn	Ser	Leu	Val	Leu		
420								425						430			
gcc	gac	agt	cac	ggg	gac	ata	atc	act	gct							1326	
Ala	Asp	Ser	His	Gly	Asp	Ile	Ile	Thr	Ala								
435								440									
<210>	13																
<211>	507																
<212>	PRT																
<213>	Homo sapiens																
<400>	13																
Met	Gly	Arg	Lys	Lys	Ile	Gln	Ile	Thr	Arg	Ile	Met	Asp	Glu	Arg	Asn		
1					5				10					15			
Arg	Gln	Val	Thr	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	Phe	Gly	Leu	Met	Lys	Lys	Ala		
20									25					30			
Tyr	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Cys	Asp	Cys	Glu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Phe		
35									40					45			
Asn	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Phe	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Asp	Met	Asp	Lys		
50									55					60			

Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Asn Ser Asp Ile Val Glu Ala Leu Asn Lys Lys Glu His Arg Gly Cys  
 85                    90                    95  
 Asp Ser Pro Asp Pro Asp Thr Ser Tyr Val Leu Thr Pro His Thr Glu  
 100                  105                  110  
 Glu Lys Tyr Lys Lys Ile Asn Glu Glu Phe Asp Asn Met Met Arg Asn  
 115                  120                  125  
 His Lys Ile Ala Pro Gly Leu Pro Pro Gln Asn Phe Ser Met Ser Val  
 130                  135                  140  
 Thr Val Pro Val Thr Ser Pro Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Gly  
 145                  150                  155                  160  
 Ser Ser Leu Val Ser Pro Ser Leu Ala Ala Ser Ser Thr Leu Thr Asp  
 165                  170                  175  
 Ser Ser Met Leu Ser Pro Pro Gln Thr Thr Leu His Arg Asn Val Ser  
 180                  185                  190  
 Pro Gly Ala Pro Gln Arg Pro Pro Ser Thr Gly Asn Ala Gly Gly Met  
 195                  200                  205  
 Leu Ser Thr Thr Asp Leu Thr Val Pro Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro  
 210                  215                  220  
 Val Gly Asn Gly Phe Val Asn Ser Arg Ala Ser Pro Asn Leu Ile Gly  
 225                  230                  235                  240  
 Ala Thr Gly Ala Asn Ser Leu Gly Lys Val Met Pro Thr Lys Ser Pro  
 245                  250                  255  
 Pro Pro Pro Gly Gly Asn Leu Gly Met Asn Ser Arg Lys Pro Asp  
 260                  265                  270  
 Leu Arg Val Val Ile Pro Pro Ser Ser Lys Gly Met Met Pro Pro Leu  
 275                  280                  285  
 Ser Glu Glu Glu Leu Glu Leu Asn Thr Gln Arg Ile Ser Ser Ser  
 290                  295                  300  
 Gln Ala Thr Gln Pro Leu Ala Thr Pro Val Val Ser Val Thr Thr Pro  
 305                  310                  315                  320  
 Ser Leu Pro Pro Gln Gly Leu Val Tyr Ser Ala Met Pro Thr Ala Tyr  
 325                  330                  335  
 Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Asp Leu Ser Ala Leu Gln Gly  
 340                  345                  350

Phe Asn Ser Pro Gly Met Leu Ser Leu Gly Gln Val Ser Ala Trp Gln  
 355 360 365  
 Gln His His Leu Gly Gln Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Ala Gly Gly  
 370 375 380  
 Gln Leu Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Ser Pro Pro Arg Asp Arg Met Thr Pro  
 405 410 415  
 Ser Gly Phe Gln Pro Pro  
 420 425 430  
 Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Arg Gln  
 435 440 445  
 Glu Met Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser  
 450 455 460  
 Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro  
 465 470 475 480  
 Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser  
 485 490 495  
 Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr  
 500 505

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1521

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(1524)

&lt;400&gt; 14

atg ggg cgg aag aaa ata caa atc aca cgc ata atg gat gaa agg aac	48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn	
1 5 10 15	
cga cag gtc act ttt aca aag aga aag ttt gga tta atg aag aaa gcc	96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
tat gaa ctt agt gtg ctc tgt gac tgt gaa ata gca ctc atc att ttc	144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	

35	40	45	
aac agc tct aac aaa ctg ttt caa tat gct agc act gat atg gac aaa			192
Asn Ser Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			
50	55	60	
gtt ctt ctc aag tat aca gaa tat aat gaa cct cat gaa agc aga acc			240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
aac tcg gat att gtt gag gct ctg aac aag aag gaa cac aga ggg tgc			288
Asn Ser Asp Ile Val Glu Ala Leu Asn Lys Lys Glu His Arg Gly Cys			
85	90	95	
gac agc cca gac cct gat act tca tat gtg cta act cca cat aca gaa			336
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Thr Ser Tyr Val Leu Thr Pro His Thr Glu			
100	105	110	
gaa aaa tat aaa aaa att aat gag gaa ttt gat aat atg atg cg aat			384
Glu Lys Tyr Lys Lys Ile Asn Glu Glu Phe Asp Asn Met Met Arg Asn			
115	120	125	
cat aaa atc gca cct ggt ctg cca cct cag aac ttt tca atg tct gtc			432
His Lys Ile Ala Pro Gly Leu Pro Pro Gln Asn Phe Ser Met Ser Val			
130	135	140	
aca gtt cca gtg acc agc ccc aat gct ttg tcc tac act aac cca ggg			480
Thr Val Pro Val Thr Ser Pro Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Gly			
145	150	155	160
agt tca ctg gtg tcc cca tct ttg gca gcc agc tca acg tta aca gat			528
Ser Ser Leu Val Ser Pro Ser Leu Ala Ala Ser Ser Thr Leu Thr Asp			
165	170	175	
tca agc atg ctc tct cca cct caa acc aca tta cat aga aat gtg tct			576
Ser Ser Met Leu Ser Pro Pro Gln Thr Thr Leu His Arg Asn Val Ser			
180	185	190	
cct gga gct cct cag aga cca cca agt act ggc aat gca ggt ggg atg			624
Pro Gly Ala Pro Gln Arg Pro Pro Ser Thr Gly Asn Ala Gly Gly Met			
195	200	205	
ttg agc act aca gac ctc aca gtg cca aat gga gct gga agc agt cca			672
Leu Ser Thr Thr Asp Leu Thr Val Pro Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro			
210	215	220	
gtg ggg aat gga ttt gta aac tca aga gct tct cca aat ttg att gga			720
Val Gly Asn Gly Phe Val Asn Ser Arg Ala Ser Pro Asn Leu Ile Gly			

225	230	235	240	
gct act ggt gca aat agc tta ggc aaa gtc atg cct aca aag tct ccc				768
Ala Thr Gly Ala Asn Ser Leu Gly Lys Val Met Pro Thr Lys Ser Pro				
245	250	255		
cct cca cca ggt ggt aat ctt gga atg aac agt agg aaa cca gat				816
Pro Pro Pro Gly Gly Asn Leu Gly Met Asn Ser Arg Lys Pro Asp				
260	265	270		
ctt cga gtt gtc atc ccc cct tca agc aag ggc atg atg cct cca cta				864
Leu Arg Val Val Ile Pro Pro Ser Ser Lys Gly Met Met Pro Pro Leu				
275	280	285		
tcg gag gaa gag gaa ttg gag ttg aac acc caa agg atc agt agt tct				912
Ser Glu Glu Glu Leu Glu Leu Asn Thr Gln Arg Ile Ser Ser Ser				
290	295	300		
caa gcc act caa cct ctt gct acc cca gtc gtg tct gtg aca acc cca				960
Gln Ala Thr Gln Pro Leu Ala Thr Pro Val Val Ser Val Thr Thr Pro				
305	310	315	320	
agc ttg cct ccg caa gga ctt gtg tac tca gca atg ccg act gcc tac				1008
Ser Leu Pro Pro Gln Gly Leu Val Tyr Ser Ala Met Pro Thr Ala Tyr				
325	330	335		
aac act gat tat tca ctg acc agc gct gac ctg tca gcc ctt caa ggc				1056
Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Asp Leu Ser Ala Leu Gln Gly				
340	345	350		
ttc aac tcg cca gga atg ctg tcg ctg gga cag gtg tcg gcc tgg cag				1104
Phe Asn Ser Pro Gly Met Leu Ser Leu Gly Gln Val Ser Ala Trp Gln				
355	360	365		
cag cac cac cta gga caa gca gcc ctc agc tct ctt gtt gct gga ggg				1152
Gln His His Leu Gly Gln Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Ala Gly Gly				
370	375	380		
cag tta tct cag ggt tcc aat tta tcc att aat acc aac caa aac atc				1200
Gln Leu Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile				
385	390	395	400	
agc atc aag tcc gaa ccg att tca cct cct cgg gat cgt atg acc cca				1248
Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Ser Pro Pro Arg Asp Arg Met Thr Pro				
405	410	415		
tcg ggc ttc cag ccg ccg				1296
Ser Gly Phe Gln Pro Pro				

420	425	430	
cca cca ccg cag ccc cag cca caa ccc ccg cag ccc cag ccc cga cag			1344
Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Arg Gln			
435	440	445	
gaa atg ggg cgc tcc cct gtg gac agt ctg agc agc tct agt agc tcc			1392
Glu Met Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser			
450	455	460	
tat gat ggc agt gat cgg gag gat cca cgg ggc gac ttc cat tct cca			1440
Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro			
465	470	475	480
att gtg ctt ggc cga ccc cca aac act gag gac aga gaa agc cct tct			1488
Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser			
485	490	495	
gta aag cga atg agg atg gac gcg tgg gtg acc			1521
Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr			
500	505		
<210> 15			
<211> 365			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 15			
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Ser Arg Ile Leu Asp Gln Arg Asn			
1	5	10	15
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala			
20	25	30	
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe			
35	40	45	
Asn Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Arg			
50	55	60	
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Ser Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
Asn Thr Asp Ile Leu Glu Thr Leu Lys Arg Arg Gly Ile Gly Leu Asp			
85	90	95	
Gly Pro Glu Leu Glu Pro Asp Glu Gly Pro Glu Glu Pro Gly Glu Lys			
100	105	110	
Phe Arg Arg Leu Ala Gly Glu Gly Asp Pro Ala Leu Pro Arg Pro			

115	120	125
Arg Leu Tyr Pro Ala Ala Pro Ala Met Pro Ser Pro Asp Val Val Tyr		
130	135	140
Gly Ala Leu Pro Pro Pro Gly Cys Asp Pro Ser Gly Leu Gly Glu Ala		
145	150	155
Leu Pro Ala Gln Ser Arg Pro Ser Pro Phe Arg Pro Ala Ala Pro Lys		
165	170	175
Ala Gly Pro Pro Gly Leu Val His Pro Leu Phe Ser Pro Ser His Leu		
180	185	190
Thr Ser Lys Thr Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Pro Thr Glu Gly Arg Arg		
195	200	205
Ser Asp Leu Pro Gly Gly Leu Ala Gly Pro Arg Gly Gly Leu Asn Thr		
210	215	220
Ser Arg Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Gln Asn Pro Cys Ser Thr Ala Thr		
225	230	235
Pro Gly Pro Pro Leu Gly Ser Phe Pro Phe Leu Pro Gly Gly Pro Pro		
245	250	255
Val Gly Ala Glu Ala Trp Ala Arg Arg Val Pro Gln Pro Ala Ala Pro		
260	265	270
Pro Arg Arg Pro Pro Gln Ser Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg		
275	280	285
Pro Pro Gly Ala Pro Ala Thr Phe Leu Arg Pro Ser Pro Ile Pro Cys		
290	295	300
Ser Ser Pro Gly Pro Trp Gln Ser Leu Cys Gly Leu Gly Pro Pro Cys		
305	310	315
Ala Gly Cys Pro Trp Pro Thr Ala Gly Pro Gly Arg Arg Ser Pro Gly		
325	330	335
Gly Thr Ser Pro Glu Arg Ser Pro Gly Thr Ala Arg Ala Arg Gly Asp		
340	345	350
Pro Thr Ser Leu Gln Ala Ser Ser Glu Lys Thr Gln Gln		
355	360	
<210> 16		
<211> 1095		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(1098)

&lt;400&gt; 16

atg	ggg	agg	aaa	aaa	atc	cag	atc	tcc	cgc	atc	ctg	gac	caa	agg	aat	48
Met	Gly	Arg	Lys	Lys	Ile	Gln	Ile	Ser	Arg	Ile	Leu	Asp	Gln	Arg	Asn	
1	5							10						15		
cgg	cag	gtg	acg	ttc	acc	aag	cgg	aag	ttc	ggg	ctg	atg	aag	aag	gcc	96
Arg	Gln	Val	Thr	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	Phe	Gly	Leu	Met	Lys	Lys	Ala	
20								25						30		
tat	gag	ctg	agc	gtg	ctc	tgt	gac	tgt	gag	ata	gcc	ctc	atc	atc	ttc	144
Tyr	Glü	Leu	Ser	Val	Leu	Cys	Asp	Cys	Glu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Phe	
35							40							45		
aac	agc	gcc	aac	cgc	ctc	ttc	cag	tat	gcc	agc	acg	gac	atg	gac	cgt	192
Asn	Ser	Ala	Asn	Arg	Leu	Phe	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Asp	Met	Asp	Arg	
50							55							60		
gtg	ctg	ctg	aag	tac	aca	gag	tac	agc	gag	ccc	cac	gag	agc	cgc	acc	240
Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	His	Glu	Ser	Arg	Thr	
65						70			75					80		
aac	act	gac	atc	ctc	gag	acg	ctg	aag	cgg	agg	ggc	att	ggc	ctc	gat	288
Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Arg	Arg	Gly	Ile	Gly	Leu	Asp	
85							90							95		
ggg	cca	gag	ctg	gag	ccg	gat	gaa	ggg	cct	gag	gag	cca	gga	gag	aag	336
Gly	Pro	Glu	Leu	Glu	Pro	Asp	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Lys	
100							105							110		
ttt	cgg	agg	ctg	gca	ggc	gaa	ggg	ggt	gat	ccg	gcc	ttg	ccc	cga	ccc	384
Phe	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro		
115							120							125		
cgg	ctg	tat	cct	gca	gtc	cct	gct	atg	ccc	agc	cca	gat	gtg	gtc	tac	432
Arg	Leu	Tyr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Met	Pro	Ser	Pro	Asp	Val	Val	Tyr	
130							135							140		
ggg	gcc	tta	ccg	cca	cca	ggc	tgt	gac	ccc	agt	ggg	ctt	ggg	gaa	gca	480
Gly	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Cys	Asp	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	
145							150							160		
ctg	ccc	gcc	cag	agc	cgc	cca	tct	ccc	ttc	cga	cca	gca	gcc	ccc	aaa	528
Leu	Pro	Ala	Gln	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Phe	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Lys	
165								170						175		

gcc	ggg	ccc	cca	ggc	ctg	gtg	cac	cct	ctc	ttc	tca	cca	agc	cac	ctc	576
Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Val	His	Pro	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	His	Leu	
180								185						190		
acc	agc	aag	aca	cca	ccc	cca	ctg	tac	ctg	ccg	acg	gaa	ggg	cgg	agg	624
Thr	Ser	Lys	Thr	Pro	Pro	Pro	Leu	Tyr	Leu	Pro	Thr	Glu	Gly	Arg	Arg	
195								200						205		
tca	gac	ctg	cct	ggt	ggc	ctg	gct	ggg	ccc	cga	ggg	gga	cta	aac	acc	672
Ser	Asp	Leu	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Thr	
210								215						220		
tcc	aga	agc	ctc	tac	agt	ggc	ctg	cag	aac	ccc	tgc	tcc	act	gca	act	720
Ser	Arg	Ser	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Gln	Asn	Pro	Cys	Ser	Thr	Ala	Thr	
225								230			235			240		
ccc	gga	ccc	cca	ctg	ggg	agc	ttc	ccc	ttc	ctc	ccc	gga	ggc	ccc	cca	768
Pro	Gly	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Phe	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	
245								250						255		
gtg	ggg	gcc	gaa	gcc	tgg	gcf	agg	agg	gtc	ccc	caa	ccc	gcf	gcf	cct	816
Val	Gly	Ala	Glu	Ala	Trp	Ala	Arg	Arg	Val	Pro	Gln	Pro	Ala	Ala	Pro	
260								265						270		
ccc	cgc	cga	ccc	ccc	cag	tca	gca	tca	agt	ctg	agc	gcc	tct	ctc	cgg	864
Pro	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Ser	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Arg	
275								280						285		
ccc	ccg	ggg	gcc	ccg	gcf	act	ttc	cta	aga	cct	tcc	cct	atc	cct	tgc	912
Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Arg	Pro	Ser	Pro	Ile	Pro	Cys	
290								295						300		
tcc	tcg	ccc	ggt	ccc	tgg	cag	agc	ctc	tgc	ggc	ctg	ggc	ccg	ccc	tgc	960
Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Trp	Gln	Ser	Leu	Cys	Gly	Leu	Gly	Pro	Pro	Cys	
305								310			315			320		
gcc	ggc	tgc	cct	tgg	ccg	acg	gct	ggc	ccc	ggt	agg	aga	tca	ccc	ggt	1008
Ala	Gly	Cys	Pro	Trp	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	
325								330						335		
ggc	acc	agc	cca	gag	cgc	tcg	cca	ggt	acg	gcf	agg	gca	cgt	ggg	gac	1056
Gly	Thr	Ser	Pro	Glu	Arg	Ser	Pro	Gly	Thr	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Asp	
340								345						350		
ccc	acc	tcc	ctc	cag	gcc	tct	tca	gag	aag	acc	caa	cag				1095
Pro	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Glu	Lys	Thr	Gln	Gln				
355								360						365		

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 465

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

Met	Gly	Arg	Lys	Lys	Ile	Gln	Ile	Thr	Arg	Ile	Met	Asp	Glu	Arg	Asn
1					5				10						15
Arg	Gln	Val	Thr	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	Phe	Gly	Leu	Met	Lys	Lys	Ala
					20				25						30
Tyr	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Cys	Asp	Cys	Glu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Phe
					35				40						45
Asn	Ser	Thr	Asn	Lys	Leu	Phe	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Asp	Met	Asp	Lys
					50				55						60
Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Glu	Pro	His	Glu	Ser	Arg	Thr
					65				70						80
Asn	Ser	Asp	Ile	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Leu	Asn	Gly	Cys
					85				90						95
Asp	Ser	Pro	Asp	Pro	Asp	Ala	Asp	Asp	Ser	Val	Gly	His	Ser	Pro	Glu
					100				105						110
Ser	Glu	Asp	Lys	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Leu	Met	Ile
					115				120						125
Ser	Arg	Gln	Arg	Leu	Cys	Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Asn	Phe	Glu	Met	Pro
					130				135						140
Val	Ser	Ile	Pro	Val	Ser	Ser	His	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Pro
					145				150						160
Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Asn	Pro	Asn	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Ser
					165				170						175
Leu	Gln	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	Val	Thr	His	Arg	Pro	Pro	Ser
					180				185						190
Ala	Gly	Asn	Thr	Gly	Gly	Leu	Met	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Ser	Gly	Ala
					195				200						205
Gly	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Tyr	Gly	Asn	Pro	Arg	Asn	Ser	Pro	Gly
					210				215						220
Leu	Leu	Val	Ser	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Met	Gln	Ala	Lys	Ser
					225				230						240
Pro	Pro	Pro	Met	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Asn	Arg	Lys	Pro	Asp	Leu	Arg

	245	250	255												
Val	Leu	Ile	Pro	Pro	Gly	Ser	Lys	Asn	Thr	Met	Pro	Ser	Val	Asn	Gln
			260				265							270	
Arg	Ile	Asn	Asn	Ser	Gln	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Ala	Thr	Pro	Val	Val
			275				280							285	
Ser	Val	Ala	Thr	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Gly	Met	Gly	Gly	Tyr	Pro
			290			295				300					
Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	Thr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Ala
			305			310			315					320	
Asp	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Phe	Asn	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	His	Leu
						325			330					335	
Gly	Ser	Val	Thr	Gly	Trp	Gln	Gln	Gln	His	Leu	His	Asn	Met	Pro	Pro
			340			345			350						
Ser	Ala	Leu	Ser	Gln	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Ser	Thr	His	Leu	Ser	Gln
			355			360			365						
Ser	Ser	Asn	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	Gln	Ser	Leu	Asn	Ile	Lys	Ser
			370			375			380						
Glu	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Asp	Arg	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Arg	Tyr
			385			390			395			400			
Pro	Gln	His	Thr	Arg	His	Glu	Ala	Gly	Arg	Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu
						405			410			415			
Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asp	Arg	Glu	Asp	His	Arg
						420			425			430			
Asn	Glu	Phe	His	Ser	Pro	Ile	Gly	Leu	Thr	Arg	Pro	Ser	Pro	Asp	Glu
						435			440			445			
Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Val	Lys	Arg	Met	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly	Trp	Ala
						450			455			460			
Thr															
<210>	18														
<211>	1395														
<212>	DNA														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<221>	CDS														
<223>	(1)..(1398)														
<400>	18														

atg ggg aga aaa aag att cag att acg agg att atg gat gaa cgt aac	48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn	
1 5 10 15	
aga cag gtg aca ttt aca aag agg aaa ttt ggg ttg atg aag aag gct	96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
tat gag ctg agc gtg ctg tgt gac tgt gag att gcg ctg atc atc ttc	144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	
35 40 45	
aac agc acc aac aag ctg ttc cag tat gcc agc acc gac atg gac aaa	192
Asn Ser Thr Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys	
50 55 60	
gtg ctt ctc aag tac acg gag tac aac gag ccg cat gag agc cgg aca	240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr	
65 70 75 80	
aac tca gac atc gtg gag acg ttg aga aag aag ggc ctt aat ggc tgt	288
Asn Ser Asp Ile Val Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Leu Asn Gly Cys	
85 90 95	
gac agc cca gac ccc gat gcg gac gat tcc gta ggt cac agc cct gag	336
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Ala Asp Asp Ser Val Gly His Ser Pro Glu	
100 105 110	
tct gag gac aag tac agg aaa att aac gaa gat att gat cta atg atc	384
Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Lys Ile Asn Glu Asp Ile Asp Leu Met Ile	
115 120 125	
agc agg caa aga ttg tgt gct gtt cca cct ccc aac ttc gag atg cca	432
Ser Arg Gln Arg Leu Cys Ala Val Pro Pro Pro Asn Phe Glu Met Pro	
130 135 140	
gtc tcc atc cca gtg tcc agc cac aac agt ttg gtg tac agc aac cct	480
Val Ser Ile Pro Val Ser Ser His Asn Ser Leu Val Tyr Ser Asn Pro	
145 150 155 160	
gtc agc tca ctg gga aac ccc aac cta ttg cca ctg gct cac cct tct	528
Val Ser Ser Leu Gly Asn Pro Asn Leu Leu Pro Leu Ala His Pro Ser	
165 170 175	
ctg cag agg aat agt atg tct cct ggt gta aca cat cga cct cca agt	576
Leu Gln Arg Asn Ser Met Ser Pro Gly Val Thr His Arg Pro Pro Ser	
180 185 190	

gca ggt aac aca ggt ggt ctg atg ggt gga gac ctc acg tct ggt gca		624	
Ala Gly Asn Thr Gly Gly Leu Met Gly Gly Asp Leu Thr Ser Gly Ala			
195	200	205	
ggc acc agt gca ggg aac ggg tat ggc aat ccc cga aac tca cca ggt		672	
Gly Thr Ser Ala Gly Asn Gly Tyr Gly Asn Pro Arg Asn Ser Pro Gly			
210	215	220	
ctg ctg gtc tca cct ggt aac ttg aac aag aat atg caa gca aaa tct		720	
Leu Leu Val Ser Pro Gly Asn Leu Asn Lys Asn Met Gln Ala Lys Ser			
225	230	235	240
cct ccc cca atg aat tta gga atg aat aac cgt aaa cca gat ctc cga		768	
Pro Pro Pro Met Asn Leu Gly Met Asn Asn Arg Lys Pro Asp Leu Arg			
245	250	255	
gtt ctt att cca cca ggc agc aag aat acg atg cca tca gtg aat caa		816	
Val Leu Ile Pro Pro Gly Ser Lys Asn Thr Met Pro Ser Val Asn Gln			
260	265	270	
agg ata aat aac tcc cag tcg gct cag tca ttg gct acc cca gtg gtt		864	
Arg Ile Asn Asn Ser Gln Ser Ala Gln Ser Leu Ala Thr Pro Val Val			
275	280	285	
tcc gta gca act cct act tta cca gga caa gga atg gga gga tat cca		912	
Ser Val Ala Thr Pro Thr Leu Pro Gly Gln Gly Met Gly Gly Tyr Pro			
290	295	300	
tca gcc att tca aca aca tat ggt acc gag tac tct ctg agt agt gca		960	
Ser Ala Ile Ser Thr Thr Tyr Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala			
305	310	315	320
gac ctg tca tct ctg tct ggg ttt aac acc gcc agc gct ctt cac ctt		1008	
Asp Leu Ser Ser Leu Ser Gly Phe Asn Thr Ala Ser Ala Leu His Leu			
325	330	335	
ggt tca gta act ggc tgg caa cag caa cac cta cat aac atg cca cca		1056	
Gly Ser Val Thr Gly Trp Gln Gln Gln His Leu His Asn Met Pro Pro			
340	345	350	
tct gcc ctc agt cag ttg gga gct tgc act agc act cat tta tct cag		1104	
Ser Ala Leu Ser Gln Leu Gly Ala Cys Thr Ser Thr His Leu Ser Gln			
355	360	365	
agt tca aat ctc tcc ctg cct tct act caa agc ctc aac atc aag tca		1152	
Ser Ser Asn Leu Ser Leu Pro Ser Thr Gln Ser Leu Asn Ile Lys Ser			
370	375	380	

gaa cct gtt tct cct cct aga gac cgt acc acc acc cct tcg aga tac	1200
Glu Pro Val Ser Pro Pro Arg Asp Arg Thr Thr Thr Pro Ser Arg Tyr	
385 390 395 400	
cca caa cac acg cgc cac gag gcg ggg aga tct cct gtt gac agc ttg	1248
Pro Gln His Thr Arg His Glu Ala Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu	
405 410 415	
agc agc tgt agc agt tcg tac gac ggg agc gac cga gag gat cac cgg	1296
Ser Ser Cys Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp His Arg	
420 425 430	
aac gaa ttc cac tcc ccc att gga ctc acc aga cct tcg ccg gac gaa	1344
Asn Glu Phe His Ser Pro Ile Gly Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp Glu	
435 440 445	
agg gaa agt ccc tca gtc aag cgc atg cga ctt tct gaa gga tgg gca	1392
Arg Glu Ser Pro Ser Val Lys Arg Met Arg Leu Ser Glu Gly Trp Ala	
450 455 460	
aca	1395
Thr	
465	
<210> 19	
<211> 521	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn	
1 5 10 15	
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	
35 40 45	
Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys	
50 55 60	
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr	
65 70 75 80	
Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys	
85 90 95	
Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu	

	100	105	110																	
Leu	Glu	Asp	Lys	Tyr	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Glu	Leu	Asp	Gly	Leu	Phe					
	115			120								125								
Arg	Arg	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Asn	Phe	Ala	Met	Pro	Val					
	130			135								140								
Thr	Val	Pro	Val	Ser	Asn	Gln	Ser	Ser	Leu	Gln	Phe	Ser	Asn	Pro	Ser					
	145			150					155				160							
Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Pro	Ser	Leu	Val	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Asp	Pro					
	165					170						175								
Arg	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Ala	Leu	Gln	Arg	Asn	Ser	Val	Ser					
	180					185					190									
Pro	Gly	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Met	Leu	Gly	Gly					
													195		200		205			
Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Asn	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Pro	Val	Gly	Asn	Gly					
													210		215		220			
Tyr	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Pro	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Gly					
													225		230		235		240	
Asn	Ser	Leu	Asn	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Lys	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr					
													245		250		255			
His	Ser	Thr	Gln	Leu	Gly	Ala	Pro	Ser	Arg	Lys	Pro	Asp	Leu	Arg	Val					
													260		265		270			
Ile	Thr	Ser	Gln	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Met	His	His	Leu	Thr	Glu	Asp					
													275		280		285			
His	Leu	Asp	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Val	Ser	Gln	Ser	Thr					
													290		295		300			
His	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Pro	Ser	Leu	Leu					
													305		310		315		320	
Ser	Gln	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Ser	Met	Pro	Thr	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asp					
													325		330		335			
Tyr	Gln	Leu	Thr	Ser	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Ser	Ser					
													340		345		350			
Pro	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Val	Thr	Ala	Trp	Gln	Gln	Pro	Gln					
													355		360		365			
Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro					
													370		375		380			
Gln	Pro	Gln	Pro																	

385	390	395	400
Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile			
405	410	415	
Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr			
420	425	430	
His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu			
435	440	445	
Arg Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro			
450	455	460	
Glu Pro Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr			
465	470	475	480
Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu			
485	490	495	
Leu Arg Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg			
500	505	510	
Met Arg Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys			
515	520		
<210> 20			
<211> 1563			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<223> (1)..(1566)			
<400> 20			
atg ggg agg aaa aag att cag atc cag cga atc acc gac gag cgg aac 48			
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn			
1	5	10	15
cga cag gtg act ttc acc aag cgg aag ttt ggc ctg atg aag aag gcg 96			
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala			
20	25	30	
tat gag ctg agc gtg cta tgt gac tgc gag atc gca ctc atc atc ttc 144			
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe			
35	40	45	
aac cac tcc aac aag ctg ttc cag tac gcc agc acc gac atg gac aag 192			
Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			

50	55	60	
gtg ctg ctc aag tac acg gag tac aat gag cca cac gag agc cgc acc			240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
aac gcc gac atc atc gag acc ctg agg aag aag ggc ttc aat ggc tgc			288
Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys			
85	90	95	
gac agc ccc gag ccc gac ggg gag gac tcg ctg gaa cag agc ccc ctg			336
Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu			
100	105	110	
ctg gag gac aag tac cga cgc gcc agc gag gag ctc gac ggg ctc ttc			384
Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Arg Ala Ser Glu Glu Leu Asp Gly Leu Phe			
115	120	125	
cgg cgc tat ggg tca act gtc ccg gcc ccc aac ttt gcc atg cct gtc			432
Arg Arg Tyr Gly Ser Thr Val Pro Ala Pro Asn Phe Ala Met Pro Val			
130	135	140	
acg gtg ccc gtg tcc aat cag agc tca ctg cag ttc agc aat ccc agc			480
Thr Val Pro Val Ser Asn Gln Ser Ser Leu Gln Phe Ser Asn Pro Ser			
145	150	155	160
gcc tcc ctg gtc acc cct tcc ctg gtg aca tca tcc ctc acg gac ccg			528
Gly Ser Leu Val Thr Pro Ser Leu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asp Pro			
165	170	175	
cgg ctc ctg tcc ccc cag cag cca gca cta cag agg aac agt gtg tct			576
Arg Leu Leu Ser Pro Gln Gln Pro Ala Leu Gln Arg Asn Ser Val Ser			
180	185	190	
cct ggc ctg ccc cag cgg cca gct agt gcg ggg gcc atg ctg ggg ggt			624
Pro Gly Leu Pro Gln Arg Pro Ala Ser Ala Gly Ala Met Leu Gly Gly			
195	200	205	
gac ctg aac agt gct aac gga gcc tgc ccc agc cct gtt ggg aat ggc			672
Asp Leu Asn Ser Ala Asn Gly Ala Cys Pro Ser Pro Val Gly Asn Gly			
210	215	220	
tac gtc agt gct cgg gct tcc cct ggc ctc ctc cct gtg gcc aat ggc			720
Tyr Val Ser Ala Arg Ala Ser Pro Gly Leu Leu Pro Val Ala Asn Gly			
225	230	235	240
aac agc cta aac aag gtc atc cct gcc aag tct ccg ccc cca cct acc			768
Asn Ser Leu Asn Lys Val Ile Pro Ala Lys Ser Pro Pro Pro Thr			

245	250	255	
cac agc acc cag ctt gga gcc ccc agc cgc aag ccc gac ctg cga gtc			816
His Ser Thr Gln Leu Gly Ala Pro Ser Arg Lys Pro Asp Leu Arg Val			
260	265	270	
atc act tcc cag gca gga aag ggg tta atg cat cac ttg act gag gac			864
Ile Thr Ser Gln Ala Gly Lys Gly Leu Met His His Leu Thr Glu Asp			
275	280	285	
cat tta gat ctg aac aat gcc cag cgc ctt ggg gtc tcc cag tct act			912
His Leu Asp Leu Asn Asn Ala Gln Arg Leu Gly Val Ser Gln Ser Thr			
290	295	300	
cat tcg ctc acc acc cca gtg gtt tct gtg gca acg ccg agt tta ctc			960
His Ser Leu Thr Thr Pro Val Val Ser Val Ala Thr Pro Ser Leu Leu			
305	310	315	320
agc cag ggc ctc ccc ttc tct tcc atg ccc act gcc tac aac aca gat			1008
Ser Gln Gly Leu Pro Phe Ser Ser Met Pro Thr Ala Tyr Asn Thr Asp			
325	330	335	
tac cag ttg acc agt gca gag ctc tcc tcc tta cca gcc ttt agt tca			1056
Tyr Gln Leu Thr Ser Ala Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Phe Ser Ser			
340	345	350	
cct ggg ggg ctg tcg cta ggc aat gtc act gcc tgg caa cag cca cag			1104
Pro Gly Gly Leu Ser Leu Gly Asn Val Thr Ala Trp Gln Gln Pro Gln			
355	360	365	
cag ccc cag cag ccg cag cag cca cag cct cca cag cag cca ccg			1152
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro			
370	375	380	
cag cca cag cag cca cag cag cct cag cag ccg caa cag cca			1200
Gln Pro Gln Pro			
385	390	395	400
cct cag caa cag tcc cac ctg gtc cct gta tct ctc agc aac ctc atc			1248
Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile			
405	410	415	
ccg ggc agc ccc ctg ccc cac gtg ggt gct gcc ctc aca gtc acc acc			1296
Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr			
420	425	430	
cac ccc cac atc agc atc aag tca gaa ccg gtg tcc cca agc cgt gag			1344
His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu			

435	440	445	
cgc agc cct gcg cct ccc cct cca gct gtg ttc cca gct gcc cgc cct			1392
Arg	Ser	Pro	Ala Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro
450	455	460	
gag cct ggc gat ggt ctc agc agc cca gcc ggg gga tcc tat gag acg			1440
Glu	Pro	Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr	
465	470	475	480
gga gac cgg gat gac gga cgg ggg gac ttc ggg ccc aca ctg ggc ctg			1488
Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu			
485	490	495	
ctg cgc cca gcc cca gag cct gag gct gag ggc tca gct gtg aag agg			1536
Leu	Arg	Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg	
500	505	510	
atg cgg ctt gat acc tgg aca tta aag			1563
Met	Arg	Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys	
515	520		
<210> 21			
<211> 217			
<212> PRT			
<213> Rattus norvegicus			
<400> 21			
Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu			
1	5	10	15
Gly Tyr Pro Phe Ala			
20	25	30	
Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile			
35	40	45	
Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr			
50	55	60	
Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr			
65	70	75	80
Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg			
85	90	95	
Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr			
100	105	110	
Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn			

115	120	125	
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala			
130	135	140	
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln			
145	150	155	160
Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val			
165	170	175	
Lys Glu Glu Lys Arg Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr			
180	185	190	
Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln			
195	200	205	
His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln			
210	215		
<210> 22			
<211> 651			
<212> DNA			
<213> Rattus norvegicus			
<220>			
<221> CDS			
<223> (1)..(654)			
<400> 22			
atg agt ctg gtg ggg ggc ttt ccc cac cac ccc gtg gtg cac cat gag			48
Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu			
1	5	10	15
ggc tac ccg ttc gcc gca gcc gca gcc gct gct gct gct gcc gcc			96
Gly Tyr Pro Phe Ala			
20	25	30	
agc cgc tgc agt cac gag gag aac ccc tat ttc cac ggc tgg ctt att			144
Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile			
35	40	45	
ggc cac ccg gag atg tcg ccc ccc gac tac agc atg gcc ctg tcc tac			192
Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr			
50	55	60	
agt ccc gag tac gcc agc ggt gcc gcg ggc ctg gac cac tcc cat tat			240
Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr			
65	70	75	80

ggg gga gtg ccg ccc ggt gcc ggg cct ccc ggc ctg ggg ggg ccg cgc	288
Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg	
85 90 95	
ccg gtg aag cgt cgg ggc acc gcc aac cgc aag gag cgg cgc agg act	336
Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr	
100 105 110	
cag agc atc aac agc gcc ttc gcc gag ctg cgc gag tgc atc ccc aac	384
Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn	
115 120 125	
gtg ccc gcc gac acc aaa ctc tcc aaa atc aag act ctg cgc ctg gcc	432
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala	
130 135 140	
acc agc tac atc gcc tac ctc atg gat ctg ctg gcc aag gac gac cag	480
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln	
145 150 155 160	
aac gga gag gcg gag gcc ttc aag gcg gag atc aag aag acc gac gtg	528
Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val	
165 170 175	
aaa gag gag aag agg aag aaa gag ctg aat gaa atc ttg aaa agt aca	576
Lys Glu Glu Lys Arg Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr	
180 185 190	
gtg agc agc aac gac aag aaa acc aaa ggc cgg aca ggc tgg cca cag	624
Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln	
195 200 205	
cac gtc tgg gcc ctg gag ctc aag cag	651
His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln	
210 215	
<210> 23	
<211> 215	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His Pro	
1 5 10 15	
His Pro Ala His Pro Met Leu His Glu Pro Phe Leu Phe Gly Pro Ala	
20 25 30	

Ser Arg Cys His Gln Glu Arg Pro Tyr Phe Gln Ser Trp Leu Leu Ser  
           35                 40                 45  
 Pro Ala Asp Ala Ala Pro Asp Phe Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Ala  
           50                 55                 60  
 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Ala Arg Pro Gly Gln  
    65                 70                 75                 80  
 Ser Pro Gly Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Arg Leu Gly Arg Arg Lys  
           85                 90                 95  
 Gly Ser Gly Pro Lys Lys Glu Arg Arg Arg Thr Glu Ser Ile Asn Ser  
           100                105                110  
 Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn Val Pro Ala Asp Thr  
    115                120                125  
 Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala  
    130                135                140  
 Tyr Leu Met Asp Val Leu Ala Lys Asp Ala Gln Ser Gly Asp Pro Glu  
    145                150                155                160  
 Ala Phe Lys Ala Glu Leu Lys Lys Ala Asp Gly Gly Arg Glu Ser Lys  
    165                170                175  
 Arg Lys Arg Glu Leu Gln Gln His Glu Gly Phe Pro Pro Ala Leu Gly  
    180                185                190  
 Pro Val Glu Lys Arg Ile Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln Gln Val  
    195                200                205  
 Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln  
       210  
<210> 24  
<211> 645  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<223> (1)..(648)  
<400> 24

atg aac ctc gtg ggc agc tac gca cac cat cac cac cat cac cac ccg	48
Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His Pro	
1                 5                 10                 15	
cac cct gcg cac ccc atg ctc cac gaa ccc ttc ctc ttc ggt ccg gcc	96

His	Pro	Ala	His	Pro	Met	Leu	His	Glu	Pro	Phe	Leu	Phe	Gly	Pro	Ala		
20															30		
tcg	cgc	tgt	cat	cag	gaa	agg	ccc	tac	ttc	cag	agc	tgg	ctg	ctg	agc	144	
Ser	Arg	Cys	His	Gln	Glu	Arg	Pro	Tyr	Phe	Gln	Ser	Trp	Leu	Leu	Ser		
35															45		
ccg	gct	gac	gct	gcc	ccg	gac	ttc	cct	gcg	ggc	ggg	ccg	ccg	ccc	gcg	192	
Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Asp	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ala		
50															60		
gcc	gct	gca	gcc	gcc	acc	gcc	tat	ggt	cct	gac	gcc	agg	cct	ggg	cag	240	
Ala	Thr	Ala	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Arg	Pro	Gln							
65															80		
agc	ccc	ggg	cgg	ctg	gag	gcg	ctt	ggc	ggc	cgt	ctt	ggc	cgg	cgg	aaa	288	
Ser	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys	
85															95		
ggc	tca	gga	ccc	aag	aag	gag	cgg	aga	cgc	act	gag	agc	att	aac	agc	336	
Gly	Ser	Gly	Pro	Lys	Lys	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Ser	
100															110		
gca	ttc	gcg	gag	ttg	cgc	gag	tgc	atc	ccc	aac	gtg	ccg	gcc	gac	acc	384	
Ala	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Cys	Ile	Pro	Asn	Val	Pro	Ala	Asp	Thr		
115															125		
aag	ctc	tcc	aag	atc	aag	act	ctg	cgc	cta	gcc	acc	agc	tac	atc	gcc	432	
Lys	Leu	Ser	Lys	Ile	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ile	Ala		
130															140		
tac	ctg	atg	gac	gtg	ctg	gcc	aag	gat	gca	cag	tct	ggc	gat	ccc	gag	480	
Tyr	Leu	Met	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Asp	Ala	Gln	Ser	Gly	Asp	Pro	Glu		
145															160		
gcc	ttc	aag	gct	gaa	ctc	aag	aag	gcg	gat	ggc	ggc	cgt	gag	agc	aag	528	
Ala	Phe	Lys	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Asp	Gly	Gly	Arg	Glu	Ser	Lys		
165															175		
cgg	aaa	agg	gag	ctg	cag	cag	cac	gaa	ggt	ttt	cct	cct	gcc	ctg	ggc	576	
Arg	Lys	Arg	Glu	Leu	Gln	Gln	His	Glu	Gly	Phe	Pro	Pro	Ala	Leu	Gly		
180															190		
cca	gtc	gag	aag	agg	att	aaa	gga	cgc	acc	ggc	tgg	ccg	cag	caa	gtc	624	
Pro	Val	Glu	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Arg	Thr	Gly	Trp	Pro	Gln	Gln	Val		
195															205		
tgg	gcg	ctg	gag	tta	aac	cag										645	

Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln  
     210                        215  
 <210> 25  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25

Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala  
     1                      5                      10                      15  
 Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu  
     20                      25                      30

Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu  
     35                      40                      45

Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu  
     50                      55                      60

Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln  
     65                      70                      75                      80

Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp  
     85                      90                      95

Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser  
     100                     105                     110

Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro  
     115                     120                     125

Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly  
     130                     135                     140

Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe  
     145                     150                     155                     160

Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro  
     165                     170                     175

Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln  
     180                     185                     190

Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala  
     195                     200                     205

Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe  
     210                     215                     220

Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu

225	230	235	240
Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
245	250	255	
Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu			
260	265	270	
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly			
275	280	285	
Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr			
290	295	300	
Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu			
305	310	315	320
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr			
325	330	335	
Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His			
340	345	350	
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu			
355	360	365	
Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr			
370	375	380	
Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly			
385	390	395	400
Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp			
405	410		

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1233

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(1236)

&lt;400&gt; 26

atg gaa agg atg agt gac tct gca gat aag cca att gac aat gat gca	48		
Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala			
1	5	10	15
gaa ggg gtc tgg agc ccc gac atc gag caa agc ttt cag gag gcc ctg	96		
Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu			

20	25	30	
gct atc tat cca cca tgt ggg agg agg aaa atc atc tta tca gac gaa			144
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu			
35	40	45	
ggc aaa atg tat ggt agg aat gaa ttg ata gcc aga tac atc aaa ctc			192
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu			
50	55	60	
agg aca ggc aag acg agg acc aga aaa cag gtg tct agt cac att cag			240
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln			
65	70	75	80
gtt ctt gcc aga agg aaa tct cgt gat ttt cat tcc aag cta aag gat			288
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp			
85	90	95	
cag act gca aag gat aag gcc ctg cag cac atg gcg gcc atg tcc tca			336
Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser			
100	105	110	
gcc cag atc gtc tcg gcc act gcc att cat aac aag ctg ggg ctg cct			384
Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro			
115	120	125	
ggg att cca cgc ccg acc ttc cca ggg gcg ccg ggg ttc tgg ccg gga			432
Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly			
130	135	140	
atg att caa aca ggg cag cca gga tcc tca caa gac gtc aag cct ttt			480
Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe			
145	150	155	160
gtg cag cag gcc tac ccc atc cag cca gcg gtc aca gcc ccc att cca			528
Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro			
165	170	175	
ggg ttt gag cct gca tcg gcc cca gct ccc tca gtc cct gcc tgg caa			576
Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln			
180	185	190	
ggt cgc tcc att ggc aca acc aag ctt cgc ctg gtg gaa ttt tca gct			624
Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala			
195	200	205	
ttt ctc gag cag cag cga gac cca gac tcg tac aac aaa cac ctc ttc			672
Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe			

210	215	220	
gtg cac att ggg cat gcc aac cat tct tac agt gac cca ttg ctt gaa			720
Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu			
225	230	235	240
tca gtg gac att cgt cag att tat gac aaa ttt cct gaa aag aaa ggt			768
Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
245	250	255	
ggc tta aag gaa ctg ttt gga aag ggc cct caa aat gcc ttc ttc ctc			816
Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu			
260	265	270	
gta aaa ttc tgg gct gat tta aac tgc aat att caa gat gat gct ggg			864
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly			
275	280	285	
gct ttt tat ggt gta acc agt cag tac gag agt tct gaa aat atg aca			912
Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr			
290	295	300	
gtc acc tgt tcc acc aaa gtt tgc tcc ttt ggg aag caa gta gta gaa			960
Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu			
305	310	315	320
aaa gta gag acg gag tat gca agg ttt gag aat ggc cga ttt gta tac			1008
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr			
325	330	335	
cga ata aac cgc tcc cca atg tgt gaa tat atg atc aac ttc atc cac			1056
Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His			
340	345	350	
aag ctc aaa cac tta cca gag aaa tat atg atg aac agt gtt ttg gaa			1104
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu			
355	360	365	
aac ttc aca att tta ttg gtg gta aca aac agg gat aca caa gaa act			1152
Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr			
370	375	380	
cta ctc tgc atg gcc tgt gtg ttt gaa gtt tca aat agt gaa cac gga			1200
Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly			
385	390	395	400
gca caa cat cat att tac agg ctt gta aag gac			
Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp			1233

	405		410														
<210>	27																
<211>	427																
<212>	PRT																
<213>	Homo sapiens																
<400>	27																
Ile	Thr	Ser	Asn	Glu	Trp	Ser	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Glu	Gly	Ser	Thr		
1					5				10						15		
Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Leu	Asp	Lys	Pro	Ile	Asp	Asn	Asp	Ala		
						20			25						30		
Glu	Gly	Val	Trp	Ser	Pro	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu		
						35			40						45		
Ala	Ile	Tyr	Pro	Pro	Cys	Gly	Arg	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Ser	Asp	Glu		
						50			55						60		
Gly	Lys	Met	Tyr	Gly	Arg	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Lys	Leu		
						65			70						80		
Arg	Thr	Gly	Lys	Thr	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Ser	His	Ile	Gln		
						85			90						95		
Val	Leu	Ala	Arg	Arg	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Gln	Ala	Lys	Leu	Lys	Asp		
						100			105						110		
Gln	Ala	Ala	Lys	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Ser	Met	Ala	Ala	Met	Ser	Ser		
						115			120						125		
Ala	Gln	Ile	Ile	Ser	Ala	Thr	Ala	Phe	His	Ser	Ser	Met	Ala	Leu	Ala		
						130			135						140		
Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Trp	Gln	Gly	Ala	Leu		
						145			150						160		
Pro	Gly	Gln	Ala	Gly	Thr	Ser	His	Asp	Val	Lys	Pro	Phe	Ser	Gln	Gln		
						165			170						175		
Thr	Tyr	Ala	Val	Gln	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Ser	Pro		
						180			185						190		
Ala	Gly	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Trp	Gln		
						195			200						205		
Gly	Arg	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Lys	Leu	Trp	Met	Leu	Glu	Phe	Ser	Ala		
						210			215						220		
Phe	Leu	Glu	Gln	Gln	Gln	Asp	Pro	Asp	Thr	Tyr	Asn	Lys	His	Leu	Phe		
						225			230						240		

Val His Ile Gly Gln Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Asp Pro Tyr Leu Glu  
                  245                     250                     255  
 Ala Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly  
                  260                     265                     270  
 Gly Leu Lys Asp Leu Phe Glu Arg Gly Pro Ser Asn Ala Phe Phe Leu  
                  275                     280                     285  
 Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Thr Asn Ile Glu Asp Glu Gly Ser  
                  290                     295                     300  
 Ser Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln Tyr Glu Ser Pro Glu Asn Met Ile  
                  305                     310                     315                     320  
 Ile Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu  
                  325                     330                     335  
 Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Tyr Glu Asn Gly His Tyr Ser Tyr  
                  340                     345                     350  
 Arg Ile His Arg Ser Pro Leu Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His  
                  355                     360                     365  
 Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu  
                  370                     375                     380  
 Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr  
                  385                     390                     395                     400  
 Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly  
                  405                     410                     415  
 Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu  
                  420                     425  
 <210> 28  
 <211> 1281  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <223> (1)..(1284)  
 <400> 28

att acc tcc aac gag tgg agc tct ccc acc tcc cct gag ggg agc acc	48
Ile Thr Ser Asn Glu Trp Ser Ser Pro Thr Ser Pro Glu Gly Ser Thr	
1                     5                     10                     15	
gcc tct ggg ggc agt cag gca ctg gac aag ccc atc gac aat gac gca	96

Ala Ser Gly Gly Ser Gln Ala Leu Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala			
20	25	30	
gag ggc gtg tgg agc ccg gat att gag cag agt ttc cag gag gcc ctc			144
Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu			
35	40	45	
gcc atc tac ccg ccc tgt ggc agg cgc aaa atc atc ctg tcg gac gag			192
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu			
50	55	60	
ggc aag atg tat ggt cgg aac gag ctg att gcc cgc tac atc aag ctc			240
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu			
65	70	75	80
cgg aca ggg aag acc cgc acc agg aag cag gtc tcc agc cac atc cag			288
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln			
85	90	95	
gtg ctg gct cgt cgc aaa gct cgc gag atc cag gcc aag cta aag gac			336
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg Glu Ile Gln Ala Lys Leu Lys Asp			
100	105	110	
cag gca gct aag gac aag gcc ctg cag agc atg gct gcc atg tcg tct			384
Gln Ala Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ala Met Ser Ser			
115	120	125	
gca cag atc atc tcc gcc acg gcc ttc cac agt agc atg gcc ctc gcc			432
Ala Gln Ile Ile Ser Ala Thr Ala Phe His Ser Ser Met Ala Leu Ala			
130	135	140	
cgg ggc ccc ggc cgc cca gca gtc tca ggg ttt tgg caa gga gct ttg			480
Arg Gly Pro Gly Arg Pro Ala Val Ser Gly Phe Trp Gln Gly Ala Leu			
145	150	155	160
cca ggc caa gcc gga acg tcc cat gat gtg aag cct ttc tct cag caa			528
Pro Gly Gln Ala Gly Thr Ser His Asp Val Lys Pro Phe Ser Gln Gln			
165	170	175	
acc tat gct gtc cag cct ccg ctg cct ctg cca ggg ttt gag tct cct			576
Thr Tyr Ala Val Gln Pro Pro Leu Pro Leu Pro Gly Phe Glu Ser Pro			
180	185	190	
gca ggg ccc gcc cca tcg ccc tct gcg ccc ccg gca ccc cca tgg cag			624
Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Trp Gln			
195	200	205	
ggc cgc agc gtg gcc agc tcc aag ctc tgg atg ttg gag ttc tct gcc			672

Gly Arg Ser Val Ala Ser Ser Lys Leu Trp Met Leu Glu Phe Ser Ala			
210	215	220	
ttc ctg gag cag cag gac ccg gac acg tac aac aag cac ctg ttc			720
Phe Leu Glu Gln Gln Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Lys His Leu Phe			
225	230	235	240
gtg cac att ggc cag tcc agc cca agc tac agc gac ccc tac ctc gaa			768
Val His Ile Gly Gln Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Asp Pro Tyr Leu Glu			
245	250	255	
gcc gtg gac atc cgc caa atc tat gac aaa ttc ccg gag aaa aag ggt			816
Ala Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
260	265	270	
gga ctc aag gat ctc ttc gaa cgg gga ccc tcc aat gcc ttt ttt ctt			864
Gly Leu Lys Asp Leu Phe Glu Arg Gly Pro Ser Asn Ala Phe Phe Leu			
275	280	285	
gtg aag ttc tgg gca gac ctc aac acc aac atc gag gat gaa ggc agc			912
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Thr Asn Ile Glu Asp Glu Gly Ser			
290	295	300	
tcc ttc tat ggg gtc tcc agc cag tat gag agc ccc gag aac atg atc			960
Ser Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln Tyr Glu Ser Pro Glu Asn Met Ile			
305	310	315	320
atc acc tgc tcc acg aag gtc tgc tct ttc ggc aag cag gtg gtg gag			1008
Ile Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu			
325	330	335	
aaa gtt gag aca gag tat gct cgc tat gag aat gga cac tac tct tac			1056
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Tyr Glu Asn Gly His Tyr Ser Tyr			
340	345	350	
cgc atc cac cgg tcc ccg ctc tgt gag tac atg atc aac ttc atc cac			1104
Arg Ile His Arg Ser Pro Leu Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His			
355	360	365	
aag ctc aag cac ctc cct gag aag tac atg atg aac agc gtg ctg gag			1152
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu			
370	375	380	
aac ttc acc atc ctg cag gtg gtc acc aac aga gac aca cag gag acc			1200
Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr			
385	390	395	400
ttg ctg tgc att gcc tat gtc ttt gag gtg tca gcc agt gag cac ggg			1248

Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly  
                         405                        410                        415  
 gct cag cac cac atc tac agg ctg gtg aaa gaa                            1281  
 Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu  
                         420                        425  
 <210> 29  
 <211> 435  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29

Ile Ala Ser Asn Ser Trp Asn Ala Ser Ser Ser Pro Gly Glu Ala Arg  
       1                  5                      10                      15  
 Glu Asp Gly Pro Glu Gly Leu Asp Lys Gly Leu Asp Asn Asp Ala Glu  
       20                  25                      30  
 Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu Ala  
       35                  40                      45  
 Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu Gly  
       50                  55                      60  
 Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu Arg  
       65                  70                      75                      80  
 Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln Val  
       85                  90                      95  
 Leu Ala Arg Lys Lys Val Arg Glu Tyr Gln Val Gly Ile Lys Ala Met  
       100                 105                     110  
 Asn Leu Asp Gln Val Ser Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ser  
       115                 120                     125  
 Met Ser Ser Ala Gln Ile Val Ser Ala Ser Val Leu Gln Asn Lys Phe  
       130                 135                     140  
 Ser Pro Pro Ser Pro Leu Pro Gln Ala Val Phe Ser Thr Ser Ser Arg  
       145                 150                     155                     160  
 Phe Trp Ser Ser Pro Pro Leu Leu Gly Gln Gln Pro Gly Pro Ser Gln  
       165                 170                     175  
 Asp Ile Lys Pro Phe Ala Gln Pro Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Pro Leu  
       180                 185                     190  
 Pro Pro Thr Leu Ser Ser Tyr Glu Pro Leu Ala Pro Leu Pro Ser Ala  
       195                 200                     205

Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg  
                          210                     215                 220

Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro  
                          225                     230                 235                 240

Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro  
                          245                     250                 255

Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr  
                          260                     265                 270

Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys  
                          275                     280                 285

Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn  
                          290                     295                 300

Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln  
                          305                     310                 315                 320

Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys  
                          325                     330                 335

Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg  
                          340                     345                 350

Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys  
                          355                     360                 365

Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys  
                          370                     375                 380

Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val  
                          385                     390                 395                 400

Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe  
                          405                     410                 415

Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu  
                          420                     425                 430

Val Lys Asp  
 <210> 30  
 <211> 1305  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <223> (1)..(1305)

&lt;400&gt; 30

ata	gct	tcc	aac	agc	tgg	aac	gcc	agc	agc	ccc	ggg	gag	gcc	cgg	48	
Ile	Ala	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Arg	
1		5					10					15				
gag	gat	ggg	ccc	gag	ggc	ctg	gac	aag	ggg	ctg	gac	aac	gat	gct	96	
Glu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Leu	Asp	Asn	Asp	Ala	Glu	
20		25					30									
ggc	gtg	tgg	agc	ccg	gac	atc	gag	cag	agc	ttc	cag	gag	gcc	ctg	144	
Gly	Val	Trp	Ser	Pro	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Ala	
35		40					45									
atc	tac	ccg	ccc	tgc	ggc	cg	cg	aag	atc	atc	ctg	tca	gac	gag	ggc	192
Ile	Tyr	Pro	Pro	Cys	Gly	Arg	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Ser	Asp	Glu	Gly	
50		55					60									
aag	atg	tac	ggc	cga	aat	gag	ttg	att	gca	cgc	tat	att	aaa	ctg	agg	240
Lys	Met	Tyr	Gly	Arg	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Lys	Leu	Arg	
65		70					75						80			
acg	ggg	aag	act	cg	acg	aga	aaa	cag	gtg	tcc	agc	cac	ata	cag	gtt	288
Thr	Gly	Lys	Thr	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Ser	His	Ile	Gln	Val	
85		90					95									
cta	gct	cg	aag	aag	gtg	cg	gag	tac	cag	gtt	ggc	atc	aag	gcc	atg	336
Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Tyr	Gln	Val	Gly	Ile	Lys	Ala	Met	
100		105					110									
aac	ctg	gac	cag	gtc	tcc	aag	gac	aaa	gcc	ctt	cag	agc	atg	gct	tcc	384
Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Ser	Lys	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Ser	Met	Ala	Ser	
115		120					125									
atg	tcc	tct	gcc	cag	atc	gtc	tct	gcc	agt	gtc	ctg	cag	aac	aag	ttc	432
Met	Ser	Ser	Ala	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Asn	Lys	Phe	
130		135					140									
agc	cca	cct	tcc	cct	ctg	ccc	cag	gcc	gtc	ttc	tcc	act	tcc	tcg	cgg	480
Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Gln	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Ser	Ser	Arg	
145		150					155						160			
ttc	tgg	agc	agc	ccc	cct	ctc	ctg	gga	cag	cag	cct	gga	ccc	tct	cag	528
Phe	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Leu	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	Pro	Ser	Gln	
165		170					175									
gac	atc	aag	ccc	ttt	gca	cag	cca	gcc	tac	ccc	atc	cag	ccg	ccc	ctg	576
Asp	Ile	Lys	Pro	Phe	Ala	Gln	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	Gln	Pro	Pro	Leu	

180	185	190	
ccg ccg acg ctc agc agt tat gag ccc ctg gcc ccg ctc ccc tca gct			624
Pro Pro Thr Leu Ser Ser Tyr Glu Pro Leu Ala Pro Leu Pro Ser Ala			
195	200	205	
gct gcc tct gtg cct gtg tgg cag gac cgt acc att gcc tcc tcc cgg			672
Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg			
210	215	220	
ctg cgg ctc ctg gag tat tca gcc ttc atg gag gtg cag cga gac cct			720
Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro			
225	230	235	240
gac acg tac agc aaa cac ctg ttt gtg cac atc ggc cag acg aac ccc			768
Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro			
245	250	255	
gcc ttc tca gac cca ccc ctg gag gca gta gat gtg cgc cag atc tat			816
Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr			
260	265	270	
gac aaa ttc ccc gag aaa aag gga gga ttg aag gag ctc tat gag aag			864
Asp Lys Phe Pro Glu Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys			
275	280	285	
ggg ccc cct aat gcc ttc ttc ctt gtc aag ttc tgg gcc gac ctc aac			912
Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn			
290	295	300	
agc acc atc cag gag ggc cgg gga gcc ttc tat ggg gtc agc tct cag			960
Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln			
305	310	315	320
tac agc tct gct gat agc atg acc atc agc gtc tcc acc aag gtg tgc			1008
Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys			
325	330	335	
tcc ttt ggc aaa cag gtg gta gag aag gtg gag act gag tat gcc agg			1056
Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg			
340	345	350	
ctg gag aac ggg cgc ttt gtg tac cgt atc cac cgc tcg ccc atg tgc			1104
Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys			
355	360	365	
gag tac atg atc aac ttc atc cac aag ctg aag cac ctg ccc gag aag			1152
Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys			

370	375	380	
tac atg atg aac agc gtg ctg gag aac ttc acc atc ctg cag gtg gtc			1200
Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val			
385	390	395	400
acg agc cggttcc cag gag acc ttg ctt gtc att gct ttt gtc ttc			1248
Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe			
405	410	415	
gaa gtc tcc acc agt gag cac ggg gcc cag cac cat gtc tac aag ctc			1296
Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu			
420	425	430	
gtc aaa gac			1305
Val Lys Asp			
435			
<210> 31			
<211> 1132			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 31			
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser			
1	5	10	15
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly			
20	25	30	
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg			
35	40	45	
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro			
50	55	60	
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu			
65	70	75	80
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val			
85	90	95	
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro			
100	105	110	
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr			
115	120	125	
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val			
130	135	140	

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val  
 145 150 155 160  
 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr  
 165 170 175  
 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly  
 180 185 190  
 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg  
 195 200 205  
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg  
 210 215 220  
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp  
 245 250 255  
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val  
 260 265 270  
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala  
 275 280 285  
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His  
 290 295 300  
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro  
 305 310 315 320  
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly  
 325 330 335  
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro  
 340 345 350  
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser  
 355 360 365  
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln  
 370 375 380  
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His  
 385 390 395 400  
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg  
 405 410 415  
 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln  
 420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu  
                  435                 440                 445  
 Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe  
                  450                 455                 460  
 Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser  
         465                 470                 475                 480  
 Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser  
                  485                 490                 495  
 Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met  
                  500                 505                 510  
 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys  
                  515                 520                 525  
 Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe  
                  530                 535                 540  
 Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe  
         545                 550                 555                 560  
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr  
                  565                 570                 575  
 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His  
                  580                 585                 590  
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln  
                  595                 600                 605  
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile  
                  610                 615                 620  
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val  
         625                 630                 635                 640  
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser  
                  645                 650                 655  
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg  
                  660                 665                 670  
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg  
                  675                 680                 685  
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro  
                  690                 695                 700  
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile  
         705                 710                 715                 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln  
                  725                    730                    735  
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His  
                  740                    745                    750  
 Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp  
                  755                    760                    765  
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser  
                  770                    775                    780  
 Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu  
                  785                    790                    795                    800  
 Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His  
                  805                    810                    815  
 Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro  
                  820                    825                    830  
 Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp  
                  835                    840                    845  
 Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu  
                  850                    855                    860  
 Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala  
                  865                    870                    875                    880  
 Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys  
                  885                    890                    895  
 Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu  
                  900                    905                    910  
 Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe  
                  915                    920                    925  
 Pro Trp Cys Gly Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser  
                  930                    935                    940  
 Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe  
                  945                    950                    955                    960  
 Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly  
                  965                    970                    975  
 Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn  
                  980                    985                    990  
 Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln  
                  995                    1000                    1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln  
 1010                    1015                    1020  
 Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala  
 1025                    1030                    1035                    1040  
 Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu  
 1045                    1050                    1055  
 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp  
 1060                    1065                    1070  
 Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr  
 1075                    1080                    1085  
 Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser  
 1090                    1095                    1100  
 Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn  
 1105                    1110                    1115                    1120  
 Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp  
 1125                    1130

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 3396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(3399)

&lt;400&gt; 32

atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc	48
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser	
1                    5                    10                    15	

cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg	96
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly	
20                    25                    30	

ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc	144
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg	
35                    40                    45	

gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg	192
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro	
50                    55                    60	

ccc ccc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg	240
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg	288
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val	
85 90 95	
ctg gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc	336
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro	
100 105 110	
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc	384
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr	
115 120 125	
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg cgc cgc gtg	432
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Arg Arg Val	
130 135 140	
ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg	480
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val	
145 150 155 160	
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac	528
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr	
165 170 175	
cag ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga	576
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro His Ala Ser Gly	
180 185 190	
ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg	624
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg	
195 200 205	
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc	672
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg	
210 215 220	
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt	720
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg	
225 230 235 240	
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg	768
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp	
245 250 255	

gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg		816	
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val			
260	265	270	
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg		864	
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala			
275	280	285	
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac		912	
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His			
290	295	300	
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct		960	
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro			
305	310	315	320
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc		1008	
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly			
325	330	335	
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc		1056	
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro			
340	345	350	
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc		1104	
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser			
355	360	365	
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag		1152	
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln			
370	375	380	
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac		1200	
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His			
385	390	395	400
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc cgg ctg cga		1248	
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg			
405	410	415	
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag		1296	
Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln			
420	425	430	
ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg		1344	
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu			
435	440	445	

gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc		1392	
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe			
450	455	460	
gtg cgg gcc tgc ctg cgc cgg ctg gtg ccc cca ggc ctc tgg ggc tcc		1440	
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser			
465	470	475	480
agg cac aac gaa cgc cgc ttc ctc agg aac acc aag aag ttc atc tcc		1488	
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser			
485	490	495	
ctg ggg aag cat gcc aag ctc tcg ctg cag gag ctg acg tgg aag atg		1536	
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met			
500	505	510	
agc gtg cgg gac tgc gct tgg ctg cgc agg agc cca ggg gtt ggc tgt		1584	
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys			
515	520	525	
gtt ccg gcc gca gag cac cgt ctg cgt gag gag atc ctg gcc aag ttc		1632	
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe			
530	535	540	
ctg cac tgg ctg atg agt gtg tac gtc gtc gag ctg ctc agg tct ttc		1680	
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe			
545	550	555	560
ttt tat gtc acg gag acc acg ttt caa aag aac agg ctc ttt ttc tac		1728	
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr			
565	570	575	
cgg aag agt gtc tgg agc aag ttg caa agc att gga atc aga cag cac		1776	
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His			
580	585	590	
ttg aag agg gtg cag ctg cgg gag ctg tcg gaa gca gag gtc agg cag		1824	
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln			
595	600	605	
cat cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc		1872	
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile			
610	615	620	
ccc aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg		1920	
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val			
625	630	635	640

gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg			1968
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser			
645	650	655	
agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc			2016
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg			
660	665	670	
ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg			2064
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg			
675	680	685	
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct			2112
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro			
690	695	700	
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc			2160
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile			
705	710	715	720
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag			2208
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln			
725	730	735	
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat			2256
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His			
740	745	750	
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac			2304
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp			
755	760	765	
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc			2352
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser			
770	775	780	
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag			2400
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Leu Asn Glu			
785	790	795	800
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac			2448
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His			
805	810	815	
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg			2496
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro			
820	825	830	

cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac		2544	
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp			
835	840	845	
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cg <sup>g</sup> gac ggg ctg ctc ctg		2592	
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu			
850	855	860	
cgt ttg gtg gat gat ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg		2640	
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala			
865	870	875	880
aaa acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc		2688	
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys			
885	890	895	
gtg gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag		2736	
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu			
900	905	910	
gcc ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc		2784	
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe			
915	920	925	
ccc tgg tgc ggc ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc		2832	
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser			
930	935	940	
gac tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc		2880	
Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe			
945	950	955	960
aac cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg		2928	
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly			
965	970	975	
gtc ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac		2976	
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn			
980	985	990	
agc ctc cag acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag		3024	
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Gln			
995	1000	1005	
gcg tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa		3072	
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln			
1010	1015	1020	

gtt tgg aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc		3120
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala		
1025	1030	1035
tcc ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg tcg ctg		3168
Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu		
1045	1050	1055
ggg gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag tgg		3216
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp		
1060	1065	1070
ctg tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt gtc acc		3264
Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr		
1075	1080	1085
tac gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg cag ctg agt		3312
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser		
1090	1095	1100
cgg aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag gcc gca gcc aac		3360
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn		
1105	1110	1115
ccg gca ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg gac		3396
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp		
1125	1130	
<210> 33		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence		
<400> 33		
ttggcttcca ggccataatt g		21
<210> 34		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 34  
aagaggcag atctatcgga 20  
<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 35  
atggatctcc tgaagggtgct 20  
<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 36  
aagaggcag atctatcgga 20  
<210> 37  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 37  
ggaagagtga gcggccatca agg 23  
<210> 38  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 38  
ctgctggaga ggttattcct cg 22  
<210> 39  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 39  
gcacaacacca acctgtccaa gttc 24  
<210> 40  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 40  
tgcaaaggct ccaggtctga gggc 24  
<210> 41  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 41  
ctctctctcc tcaggacaa 19  
<210> 42  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 42  
tggagcaaaa cagaatggct gg 22  
<210> 43  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 43  
ctgagatgtc tctctcttc ttag 24  
<210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 44  
acaatgactg atgagagatg 20  
<210> 45  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 45  
cagacctgaa ggagacct 18  
<210> 46  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 46  
gtcagcgtaa acagttgc 18  
<210> 47  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 47  
gccaagaagg ggatagaagg 20  
<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 48  
ctgtggttca gggctcagtc 20  
<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 49  
cagtggagct ggacaaagcc 20  
<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 50  
tagcgacggt tctggaacca 20  
<210> 51  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 51  
ctgtcatctc actatggca 20  
<210> 52  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 52  
ccaagtccga gcaggaattt 20  
<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 53  
aagacgtcaa gccctttgtg 20  
<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 54  
aaaggagcac actttgggtgg 20  
<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 55  
agcaagaata cgatgccatc 20  
<210> 56  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 56  
gaaggggtgg tggtagcggtc 20  
<210> 57  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence  
<400> 57  
tggaatggc tatgtcagtg 20  
<210> 58  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 58

ctggtaatct gtgttgttagg

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 59

caagggcctc tccaaacttg

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 60

gccccagaga cagcattcca

20

<210> 61

<211> 268

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Ala Gln Pro Leu Cys Pro Pro Leu Ser Glu Ser Trp Met Leu Ser

1

5

10

15

Ala Ala Trp Gly Pro Thr Arg Arg Pro Pro Pro Ser Asp Lys Asp Cys

20

25

30

Gly Arg Ser Leu Val Ser Ser Pro Asp Ser Trp Gly Ser Thr Pro Ala

35

40

45

Asp Ser Pro Val Ala Ser Pro Ala Arg Pro Gly Thr Leu Arg Asp Pro  
50 55 60

Arg Ala Pro Ser Val Gly Arg Arg Gly Ala Arg Ser Ser Arg Leu Gly  
65 70 75 80

Ser Gly Gln Arg Gln Ser Ala Ser Glu Arg Glu Lys Leu Arg Met Arg  
85 90 95

Thr Leu Ala Arg Ala Leu His Glu Leu Arg Arg Phe Leu Pro Pro Ser  
100 105 110

Val Ala Pro Ala Gly Gln Ser Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Leu  
115 120 125

Ala Ile Arg Tyr Ile Gly His Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Ser Glu  
130 135 140

Glu Ser Leu Gln Arg Arg Cys Arg Gln Arg Gly Asp Ala Gly Ser Pro  
145 150 155 160

Arg Gly Cys Pro Leu Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Gln Met Gln Thr  
165 170 175

Arg Thr Gln Ala Glu Gly Gln Gly Arg Gly Leu Gly Leu Val  
180 185 190

Ser Ala Val Arg Ala Gly Ala Ser Trp Gly Ser Pro Pro Ala Cys Pro  
195 200 205

Gly Ala Arg Ala Ala Pro Glu Pro Arg Asp Pro Pro Ala Leu Phe Ala  
210 215 220

Glu Ala Ala Cys Pro Glu Gly Gln Ala Met Glu Pro Ser Pro Pro Ser  
225 230 235 240



acg ctg gcc cgc gcc ctg cac gag ctg cgc cgc ttt cta ccg ccg tcc			336
Thr Leu Ala Arg Ala Leu His Glu Leu Arg Arg Phe Leu Pro Pro Ser			
100	105	110	
gtg gcg ccc gcg ggc cag agc ctg acc aag atc gag acg ctg cgc ctg			384
Val Ala Pro Ala Gly Gln Ser Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Leu			
115	120	125	
gct atc cgc tat atc ggc cac ctg tcg gcc gtg cta ggc ctc agc gag			432
Ala Ile Arg Tyr Ile Gly His Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Ser Glu			
130	135	140	
gag agt ctc cag cgc cgg tgc cgg cag cgc ggt gac gcg ggg tcc cct			480
Glu Ser Leu Gln Arg Arg Cys Arg Gln Arg Gly Asp Ala Gly Ser Pro			
145	150	155	160
cgg ggc tgc ccg ctg tgc ccc gac gac tgc ccc gcg cag atg cag aca			528
Arg Gly Cys Pro Leu Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Gln Met Gln Thr			
165	170	175	
cgg acg cag gct gag ggg cag ggg cag ggg cgc ggg ctg ggc ctg gta			576
Arg Thr Gln Ala Glu Gly Gln Gly Arg Gly Leu Gly Leu Val			
180	185	190	
tcc gcc gtc cgc gcc ggg gcg tcc tgg gga tcc ccg cct gcc tgc ccc			624
Ser Ala Val Arg Ala Gly Ala Ser Trp Gly Ser Pro Pro Ala Cys Pro			
195	200	205	
gga gcc cga gct gca ccc gag ccg cgc gac ccg cct gcg ctg ttc gcc			672
Gly Ala Arg Ala Ala Pro Glu Pro Arg Asp Pro Pro Ala Leu Phe Ala			
210	215	220	
gag gcg gcg tgc cct gaa ggg cag gcg atg gag cca agc cca ccg tcc			720
Glu Ala Ala Cys Pro Glu Gly Gln Ala Met Glu Pro Ser Pro Pro Ser			
225	230	235	240

ccg ctc ctt ccg ggc gac gtg ctg gct ctg ttg gag acc tgg atg ccc 768  
Pro Leu Leu Pro Gly Asp Val Leu Ala Leu Leu Glu Thr Trp Met Pro  
245 250 255

ctc tcg cct ctg gag tgg ctg cct gag gag ccc aag 804  
Leu Ser Pro Leu Glu Trp Leu Pro Glu Glu Pro Lys  
260 265

<210> 63  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 63

Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu  
1 5 10 15

Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe  
20 25 30

Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg  
35 40 45

Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His  
50 55 60

Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly  
65 70 75 80

Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg  
85 90 95

Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys  
100 105 110

Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Asp Cys Val  
115 120 125

Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala  
 130                    135                    140

Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg  
 145                    150                    155                    160

Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys  
 165                    170                    175

Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu  
 180                    185                    190

Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg  
 195                    200                    205

Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg  
 210

<210> 64

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(648)

<400> 64

atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg    48  
 Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu  
 1                    5                    10                    15

gtc ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt    96  
 Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe  
 20                    25                    30

aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc    144

Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg			
35	40	45	
cgc ctc atc cgg acc tac caa ctc tac agc cgc acc agc ggg aag cac			192
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His			
50	55	60	
gtg cag gtc ctg gcc aac aag cgc atc aac gcc atg gca gag gac ggc			240
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly			
65	70	75	80
gac ccc ttc gca aag ctc atc gtg gag acg gac acc ttt gga agc aga			288
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg			
85	90	95	
gtt cga gtc cga gga gcc gag acg ggc ctc tac atc tgc atg aac aag			336
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys			
100	105	110	
aag ggg aag ctg atc gcc aag agc aac ggc aaa ggc aag gac tgc gtc			384
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val			
115	120	125	
ttc acg gag att gtg ctg gag aac aac tac aca gcg ctg cag aat gcc			432
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala			
130	135	140	
aag tac gag ggc tgg tac atg gcc ttc acc cgc aag ggc cgg ccc cgc			480
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg			
145	150	155	160
aag ggc tcc aag acg cgg cag cac cag cgt gag gtc cac ttc atg aag			528
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys			
165	170	175	
cgg ctg ccc cgg ggc cac cac acc acc gag cag agc ctg cgc ttc gag			576

Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu  
 180                            185                            190

ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg    624  
 Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg  
 195                            200                            205

act tgg gcc ccg gaa ccc cga    645  
 Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg  
 210    215

<210> 65

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln  
 1                                5    10    15

Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly  
 20    25    30

Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg  
 35    40    45

Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val  
 50    55    60

Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val  
 65    70    75    80

Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn  
 85    90    95

Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala  
 100    105    110

Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu  
 115                            120                            125

Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys  
 130                            135                            140

Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu  
 145                            150                            155                            160

Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln  
 165                            170                            175

Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp  
 180                            185                            190

Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn  
 195                            200                            205

Arg Ala His Trp

210

<210> 66

<211> 636

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(639)

<400> 66

atg gat tat ttg ctc atg att ttc tct ctg ctg ttt gtg gct tgc caa 48  
 Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln

1

5

10

15

gga gct cca gaa aca gca gtc tta ggc gct gag ctc agc gcg gtg ggt 96  
 Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly  
 20                            25                            30

gag aac ggc ggg gag aaa ccc act ccc agt cca ccc tgg cgg ctc cgc			144
Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg			
35	40	45	
cggtcc aag cgc tgc tcc tgc tcg tcc ctg atg gat aaa gag tgt gtc			192
Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val			
50	55	60	
tac ttc tgc cac ctg gac atc att tgg gtc aac act ccc gag cac gtt			240
Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val			
65	70	75	80
gtt ccg tat gga ctt gga agc cct agg tcc aag aga gcc ttg gag aat			288
Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn			
85	90	95	
tta ctt ccc aca aag gca aca gac cgt gag aat aga tgc caa tgt gct			336
Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala			
100	105	110	
agc caa aaa gac aag aag tgc tgg aat ttt tgc caa gca gga aaa gaa			384
Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu			
115	120	125	
ctc agg gct gaa gac att atg gag aaa gac tgg aat aat cat aag aaa			432
Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys			
130	135	140	
gga aaa gac tgt tcc aag ctt ggg aaa aag tgt att tat cag cag tta			480
Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu			
145	150	155	160
gtg aga gga aga aaa atc aga agt tca gag gaa cac cta aga caa			528
Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln			
165	170	175	

acc agg tcg gag acc atg aga aac agc gtc aaa tca tct ttt cat gat 576  
 Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp  
                   180                  185                  190

ccc aag ctg aaa ggc aag ccc tcc aga gag cgt tat gtg acc cac aac 624  
 Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn  
                   195                  200                  205

cga gca cat tgg 636  
 Arg Ala His Trp  
                   210  
 <210> 67  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 67  
 Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
       1                  5                  10                  15

Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly  
       20                  25                  30

Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser  
       35                  40                  45

Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln  
       50                  55                  60

Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe  
       65                  70                  75                  80

Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly  
       85                  90                  95

Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr  
       100                105                  110

Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro  
 115                    120                    125

Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp  
 130                    135                    140

<210> 68

<211> 429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(432)

<400> 68

atg cag cac cga ggc ttc ctc ctc acc ctc ctc gcc ctg ctg gcg    48

Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1                    5                    10                    15

ctc acc tcc gcg gtc gcc aaa aag aaa gat aag gtg aag aag ggc ggc    96  
 Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly

20                    25                    30

ccg ggg agc gag tgc gct gag tgg gcc tgg ggg ccc tgc acc ccc agc    144  
 Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser  
 35                    40                    45

agc aag gat tgc ggc gtg ggt ttc cgc gag ggc acc tgc ggg gcc cag    192  
 Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln  
 50                    55                    60

acc cag cgc atc cgg tgc agg gtg ccc tgc aac tgg aag aag gag ttt    240  
 Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe  
 65                    70                    75                    80

gga gcc gac tgc aag tac aag ttt gag aac tgg ggt gcg tgt gat ggg    288  
 Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly

	85	90	95	
ggc aca ggc acc aaa gtc cgc caa ggc acc ctg aag aag gcg cgc tac				336
Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr				
100	105	110		
aat gct cag tgc cag gag acc atc cgc gtc acc aag ccc tgc acc ccc				384
Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro				
115	120	125		
aag acc aaa gca aag gcc aaa gcc aag aaa ggg aag gga aag gac				429
Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp				
130	135	140		
<210> 69				
<211> 408				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 69				
Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val				
1	5	10	15	
Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys				
20	25	30		
Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly				
35	40	45		
Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met				
50	55	60		
Phe Gly Leu Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro				
65	70	75	80	
Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu				
85	90	95		

Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser  
100 105 110

Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn  
115 120 125

Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu  
130 135 140

Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu  
145 150 155 160

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His  
165 170 175

Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro  
180 185 190

Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn  
195 200 205

Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp  
210 215 220

Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His  
225 230 235 240

Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg  
245 250 255

Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu  
260 265 270

Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg  
275 280 285

Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys  
 290                            295                            300

Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val  
 305                            310                            315                            320

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr  
 325                            330                            335

Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr  
 340                            345                            350

Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile  
 355                            360                            365

Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu  
 370                            375                            380

Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met  
 385                            390                            395                            400

Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg  
 405

<210> 70

<211> 1224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1227)

<400> 70

atg att cct ggt aac cga atg ctg atg gtc gtt tta tta tgc caa gtc    48  
 Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val

1

5

10

15

ctg cta gga ggc gcg agc cat gct agt ttg ata cct gag acg ggg aag    96

Leu	Leu	Gly	Gly	Ala	Ser	His	Ala	Ser	Leu	Ile	Pro	Glu	Thr	Gly	Lys	
20																30
aaa	aaa	gtc	gcc	gag	att	cag	ggc	cac	gcg	gga	gga	cgc	cgc	tca	ggg	144
Lys	Lys	Val	Ala	Glu	Ile	Gln	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Arg	Arg	Ser	Gly	
35																45
cag	agc	cat	gag	ctc	ctg	cgg	gac	ttc	gag	gcg	aca	ctt	ctg	cag	atg	192
Gln	Ser	His	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu	Gln	Met	
50																60
ttt	ggg	ctg	cgc	cgc	ccg	cag	cct	agc	aag	agt	gcc	gtc	att	ccg		240
Phe	Gly	Leu	Arg	Arg	Pro	Gln	Pro	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Ile	Pro		
65																80
gac	tac	atg	cgg	gat	ctt	tac	cg <sup>g</sup>	ctt	cag	tct	ggg	gag	gag	gaa		288
Asp	Tyr	Met	Arg	Asp	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Glu	Glu	Glu		
85																95
gag	cag	atc	cac	agc	act	ggt	ctt	gag	tat	cct	gag	cgc	ccg	gcc	agc	336
Glu	Gln	Ile	His	Ser	Thr	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Glu	Arg	Pro	Ala	Ser	
100																110
cg <sup>g</sup>	gcc	aac	acc	gtg	agg	agc	ttc	cac	cac	gaa	gaa	cat	ctg	gag	aac	384
Arg	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	His	His	Glu	Glu	His	Leu	Glu	Asn	
115																125
atc	cca	ggg	acc	agt	gaa	aac	tct	gct	ttt	cgt	ttc	ctc	ttt	aac	ctc	432
Ile	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Asn	Ser	Ala	Phe	Arg	Phe	Leu	Phe	Asn	Leu	
130																140
agc	agc	atc	cct	gag	aac	gag	gcg	atc	tcc	tct	gca	gag	ctt	cg <sup>g</sup>	ctc	480
Ser	Ser	Ile	Pro	Glu	Asn	Glu	Ala	Ile	Ser	Ser	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	
145																160
ttc	cgg	gag	cag	gtg	gac	cag	ggc	cct	gat	tgg	gaa	agg	ggc	ttc	cac	528

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His  
 165 170 175

cgt ata aac att tat gag gtt atg aag ccc cca gca gaa gtg gtg cct 576  
 Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro  
 180 185 190

ggg cac ctc atc aca cga cta ctg gac acg aga ctg gtc cac cac aat 624  
 Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn  
 195 200 205

gtg aca cgg tgg gaa act ttt gat gtg agc cct gcg gtc ctt cgc tgg 672  
 Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp  
 210 215 220

acc cgg gag aag cag cca aac tat ggg cta gcc att gag gtg act cac 720  
 Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His  
 225 230 235 240

ctc cat cag act cgg acc cac cag ggc cag cat gtc agg att agc cga 768  
 Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg  
 245 250 255

tcg tta cct caa ggg agt ggg aat tgg gcc cag ctc cgg ccc ctc ctg 816  
 Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu  
 260 265 270

gtc acc ttt ggc cat gat ggc cgg ggc cat gcc ttg acc cga cgc cgg 864  
 Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg  
 275 280 285

agg gcc aag cgt agc cct aag cat cac tca cag cgg gcc agg aag aag 912  
 Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys  
 290 295 300

aat aag aac tgc cgg cgc cac tcg ctc tat gtg gac ttc agc gat gtg 960

Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val				
305	310	315	320	
ggc tgg aat gac tgg att gtg gcc cca cca ggc tac cag gcc ttc tac				1008
Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr				
325	330	335		
tgc cat ggg gac tgc ccc ttt cca ctg gct gac cac ctc aac tca acc				1056
Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr				
340	345	350		
aac cat gcc att gtg cag acc ctg gtc aat tct gtc aat tcc agt atc				1104
Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile				
355	360	365		
ccc aaa gcc tgt tgt gtg ccc act gaa ctg agt gcc atc tcc atg ctg				1152
Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu				
370	375	380		
tac ctg gat gag tat gat aag gtg gta ctg aaa aat tat cag gag atg				1200
Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met				
385	390	395	400	
gta gta gag gga tgt ggg tgc cgc				1224
Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg				
405				
<210> 71				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<400> 71				
ccccgcgctc caactgctct gatg				24
<210> 72				
<211> 24				
<212> DNA				

<213> Artificial Sequence	
<400> 72	
tgcctacggt ggtgcgccct ctgc	24
<210> 73	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 73	
gaagcgcaac agggccatca cg	22
<210> 74	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 74	
ccacgtcacg caggtcccg t c	22
<210> 75	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 75	
gatcctgttc tctgcctctg ga	22
<210> 76	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 76	
tcatccactt tgtccacccg ag	22
<210> 77	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<400> 77	
ttcctcgct tggcctttg g	21
<210> 78	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 78	
gctggatctt cgtaggctcc g	21
<210> 79	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 79	
ggcaagctga ccctgaagt	19
<210> 80	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 80	
gggtgctcag gtagtggtt	19

出願人又は代理人の書類記号 1217WO3	国際出願番号
--------------------------	--------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

REC'D 19 JAN 2001

WIPO PCT

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

14 頁、 6 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている 

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付

22.02.00

受託番号

F E R M B P - 7 0 4 3

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている 

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28 (4) EPC)。

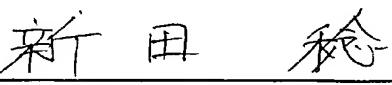
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

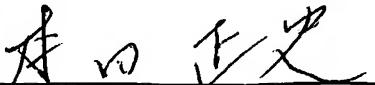
受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員 

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日  
19 JAN 2001

権限のある職員 

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09323

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06, A61P 9/04// A61K 38/18, C12N 15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06, A61P 9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Makino, S. et al., "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells <i>in vitro</i> ", J. Clin. Invest. (March, 1999) Vol.103, No.5, pp.697-705	1-6, 8-91
X	Keichi FUKUDA, "Kotsuzui Saibou kara no Shinkin Saibou no Yuudo", HUMAN CELL (September, 1999) Vol.12, No.3, pp.159-162	1-6, 8-91
X	Guan, K. et al., "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation <i>in vitro</i> ", Cytotechnology (May, 1999) Vol.30, Nos.1-3, pp.211-226	7-18, 23, 24
X	Kolossov, E. et al., "Functional characteristics of ES cell-derived Cardiac Precursor Cells Identified by Tissue-specific Expression of the Green Fluorescent Protein" J. Cell Biol. (1998) Vol.143, No.7, pp.2045-2056	7-18, 23, 24
P, X	Xiaoxia, G. et al., "Properties and applications of embryonic stem cells" Chinese Science Bulletin (July, 2000) Vol.45, No.14, pp.1258-1265	7-18, 23, 24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 March, 2001 (29.03.01)

Date of mailing of the international search report  
17 April, 2001 (17.04.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06,  
A61P 9/04// A61K 38/18, C12N 15/12

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06,  
A61P 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Makino, S. et al., "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells <i>in vitro</i> ", J. Clin. Invest. (March, 1999) Vol. 103, No. 5, p. 697-705	1-6, 8-91
X	福田恵一, "骨髄細胞からの心筋細胞の誘導", HUMAN CELL (Sept. 1999) Vol. 12, No. 3, p. 159-162	1-6, 8-91

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29. 03. 01	国際調査報告の発送日 17.04.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 印 4B 9735

## C(続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Guan, K. et al., "Embryonic stem cell differentiation models:cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation <i>in vitro</i> ", Cytotechnology (May, 1999) Vol. 30, No. 1-3, p. 211-226	7-18, 23, 24
X	Kolossov, E. et al., "Functional characteristics of ES cell-derived Cardiac Precursor Cells Identified by Tissue-specific Expression of the Green Fluorescent Protein" J. Cell Biol. (1998) Vol. 143, No. 7, p. 2045-2056	7-18, 23, 24
P, X	Xiaoxia, G. et al., "Properties and applications of embryonic stem cells" Chinese Science Bulletin (July, 2000) Vol. 45, No. 14, p. 1258-1265	7-18, 23, 24